

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2021

Bc. Viktorie Scholasterová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**STUDIUM MIGRACE MESENCHYMÁLNÍCH KMENOVÝCH
BUNĚK V EXTRACELULÁRNÍM MATRIX NA PRINCIPU
CHEMOTAXE**

STUDY OF MESENCHYMAL STEM CELL MIGRATION IN THE EXTRACELLULAR MATRIX BASED ON
PRINCIPLES OF CHEMOTAXIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Viktorie Scholasterová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Larisa Chmelíková

BRNO 2021

Diplomová práce

magisterský navazující studijní program **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Bc. Viktorie Scholasterová

ID: 195195

Ročník: 2

Akademický rok: 2020/21

NÁZEV TÉMATU:

Studium migrace mesenchymálních kmenových buněk v extracelulárním matrix na principu chemotaxe

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Provedte literární rešerši v oblasti sledování migrace buněk in vitro v extracelulárním matrix (ECM). 2) Navrhněte experiment pro studium migrace mesenchymálních kmenových buněk (MSC) v ECM na principu chemotaxe. 3) Nastudujte kultivaci buněčné linie MSC a prakticky ověřte v buněčné laboratoři. 4) Navržený experiment otestujte s dostatečným počtem opakování. 5) Provedte sběr mikroskopických dat. Ve vhodném programovém prostředí zpracujte nasnímaná data a vyhodnoťte migraci buněk. 6) Dosažené výsledky důkladně diskutujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] DE PASCALIS, Chiara, Sandrine ETIENNE-MANNEVILLE a Valerie Marie WEAVER. Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. Molecular Biology of the Cell. 2017, 28(14), 1833-1846. ISSN 1059-1524.

[2] KABIRI, Azadeh, Ebrahim ESFANDIARI, Batool HASHEMIBENI, Mohammad KAZEMI, Mohammad MARDANI a Abolghasem ESMAEILI. Effects of FGF-2 on human adipose tissue derived adult stem cells morphology and chondrogenesis enhancement in Transwell culture. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2012, 424(2), 234-238. ISSN 0006-291X.

Termín zadání: 8.2.2021

Termín odevzdání: 21.5.2021

Vedoucí práce: Larisa Chmelíková

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda rady studijního programu

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zbývá studiem migrace mesenchymálních kmenových buněk v extracelulární matrix na principu chemotaxe. Nejdříve je pozornost upřena na teoretickou část spojenou s objasněním základních termínů, jakými jsou na příklad extracelulární matrix, migrace, konfokální mikroskopie, mesenchymální kmenové buňky nebo chemotaxe. Také je obsažen výčet a popis některých základních metod určených pro sledování migrace buněk a podrobnější popis metody transwell testu, který je zvolen pro experiment v praktické části této práce. Její součástí jsou protokoly jednotlivých kroků pro přípravu experimentu, postup zpracování dat získaných snímáním buněk konfokálním mikroskopem a popis výsledných hodnot konfluencí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mesenchymální kmenové buňky, migrace, extracelulární matrix, chemotaxe, transwell test, konfluence

ABSTRACT

This thesis engages in a study of mesenchymal stem cell migration in extracellular matrix based on principles of chemotaxis. First, attention is focused on a theoretical part associated with a clarification of basic terms such as extracellular matrix, migration, confocal microscopy, mesenchymal stem cells or chemotaxis. There is also included a list and a description of some basic methods for monitoring cell migration and a more detailed description of a method called transwell assay, which has been chosen for an experiment in a practical part of this thesis. This part includes protocols of individual steps for the preparation of the experiment, the procedure of data processing obtained by scanning cells with a confocal microscope and a description of the resulting confluence values.

KEYWORDS

Mesenchymal stem cells, migration, extracellular matrix, chemotaxis, transwell assay, confluence

SCHOLASTEROVÁ, Viktorie. *Studium migrace mesenchymálních kmenových buněk v extracelulární matrix na principu chemotaxe*. Brno, 2021, 62 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce: Larisa Chmelíková

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma „Studium migrace mesenchymálních kmenových buněk v extracelulárním matrix na principu chemotaxe“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Brno

.....

podpis autorky

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych velice poděkovala vedoucí diplomové práce paní Larise Chmelíkové za odborné vedení, konzultace, trpělivost a podnětné návrhy k práci.

Obsah

Úvod	10
1 Migrace buněk v extracelulárním matrix	11
1.1 Migrace jednotlivých buněk	12
1.2 Kolektivní migrace buněk	13
1.3 Metody sledování migrace buněk	16
1.4 Konfokální mikroskopie	22
2 Mesenchymální kmenové buňky	25
2.1 Chemotaxe MSC buněk	26
2.2 <i>Homing</i> a komunikační osa SDF-1/CXCR4	27
3 Praktická část práce	30
3.1 Seznam potřebného vybavení a přístrojů	30
3.2 Seznam potřebných chemikálií	31
3.3 Kultivace MSC	32
3.4 Barvení MSC fluorescenčním barvivem CMFDA	32
3.5 Pasážování MSC	33
3.6 Výpočet koncentrace buněk v suspenzi pomocí Bürkerovy komůrky	34
3.7 Příprava kolagenového gelu	35
3.8 Příprava Transwell testu	37
3.9 Barvení jader MSC fluorescenčním barvivem DAPI	38
4 Zpracování dat	41
4.1 Konfluence před seškrábnutím	41
4.2 Konfluence po seškrábnutím	43
4.3 Počet buněk migrovaných skrz membránu	44
5 Výsledky experimentů	48
5.1 Experiment 1	49
5.2 Experiment 2	49
5.3 Experiment 3	50
5.4 Experiment 4	51
5.5 Experiment 5	51
5.6 Experiment 6	52
5.7 Experiment 7	52
Závěr	54

Literatura	57
Seznam symbolů, veličin a zkratk	62

Seznam obrázků

1.1	Rozdělení způsobů migrace buněk. Upraveno dle [17]	12
1.2	Postup migrace buňky. 1. Extenze: polymerizace aktinových sítí a vytvoření výběžku. 2. Fokální adheze: uchycení výběžku k podkladu. 3. Kontrakce: tažnou silou adherovaných výběžků je buňka kontrahována vpřed. 4. Zrušení adheze: v zadní části buňky jsou přerušeny adheze a celá buňka se tak pohybuje vpřed. Upraveno dle [16]	14
1.3	Scratch wound healing assay - detail zacelování rýhy v čase 0 h, 24 h, 72 h a 120 h. [10]	17
1.4	Rozdíl postupu při testu pomocí zóny vyloučení (A) a scratch wound healing assay (B). Upraveno dle [9]	17
1.5	Zacelování prázdného prostoru vytvořeného elektrodou. [11]	18
1.6	Schéma Dunnovy komůrky (A) a jejího průřezu (B). Upraveno dle [12] .	19
1.7	Schéma μ -Slide Chemotaxis (konkrétně 3D experiment migrujících buněk v gelu). [14]	20
1.8	Schéma jamky transwell testu (neboli Boydenovy komůrky). [10] . . .	21
1.9	Ukázky variant transwell testu. Upraveno dle [7]	23
1.10	Schéma konfokálního mikroskopu. Upraveno dle [24]	24
2.1	Schéma procesu <i>homing</i> , kdy na místě zranění je upregulován SDF-1 (CXCL12) a slouží jako chemoatraktant pro MSC, které na svém povrchu exprimují receptor CXCR4. Upraveno dle [5]	28
3.1	Schéma průběhu experimentu.	31
3.2	Fluorescenční spektra barviva CellTracker™ Green CMFDA, přerušovanou čarou znázorněno excitační a plně emisní spektrum. Upraveno dle [21]	33
3.3	Schéma mřížky Bürkerovy komůrky. [19]	36
3.4	Fluorescenční spektra barviva DAPI, přerušovanou čarou znázorněno excitační a plně emisní spektrum. Upraveno dle [34]	38
3.5	Fluorescenční spektra barviv CMFDA (zeleně) a DAPI (modře), přerušovanou čarou znázorněno excitační a plně emisní spektrum, tenkou čarou (fialovou, modrou) znázorněn nastavený excitační filtr a širokým pásmem (modrým, zeleným) znázorněn nastavený emisní filtr pro snímání. Upraveno dle [34]	40

4.1	(a) Snímek z bright field kanálu konfokálního mikroskopu, (b) Snímek zpracovaného šedotónového snímku s červeně vyznačenými detekovanými buňkami, (c) Pseudobarvený snímek z fluorescenčního konfokálního mikroskopu s nastavením pro snímání modrého barviva DAPI, (d) Snímek (c) v šedotónové podobě, (e) Pseudobarvený snímek z fluorescenčního konfokálního mikroskopu s nastavením pro snímání zeleného barviva CMFDA, (f) Snímek (e) v šedotónové podobě. . . .	45
4.2	Rozdíl mezi membránou před a po seškrábnutí gelu (jamka (I) - negativní kontrola).	46
4.3	Snímek membrány po seškrábnutí gelu s červeně vyznačenou oblastí 12 čtverců.	47
5.1	Grafy vyhodnocení experimentu 1 před a po seškrábnutí gelu.	49
5.2	Grafy vyhodnocení experimentu 2 před a po seškrábnutí gelu.	50
5.3	Grafy vyhodnocení experimentu 3 před a po seškrábnutí gelu.	50
5.4	Grafy vyhodnocení experimentu 4 před a po seškrábnutí gelu.	51
5.5	Grafy vyhodnocení experimentu 5 před a po seškrábnutí gelu.	52
5.6	Grafy vyhodnocení experimentu 6 před a po seškrábnutí gelu.	52
5.7	Grafy vyhodnocení experimentu 7 před a po seškrábnutí gelu.	53

Úvod

Ve využití mesenchymálních kmenových buněk je viděn velký potenciál v široké škále odvětví medicíny. Ovšem jejich vlastnosti a chování v organismu nejsou stále zcela pochopeny a probádány. Tato diplomová práce se zaměřuje na studium jejich migrace *in vitro* v extracelulárním matrix na principu chemotaxe.

V první kapitole je objasněn pojem extracelulární matrix a její vztah k migrujícím buňkám. Buňky mohou migrovat několika způsoby. Základním rozdělením je migrace buněk samostatně či ve skupinách kolektivně. Jedná se vždy o složitý a komplexní proces, který je v této části práce blíže nastíněn. Pro sledování migrace buněk bylo během let vyvinuto nespočet různých metod. Ovšem pro každý typ buněk, způsob jejich pohybu a další sledované specifické vlastnosti je nutno vybrat tu nejvhodnější. Proto následuje výčet a popis metod, které patří k těm základním či nejpoužívanějším. Součástí je i podrobnější vysvětlení funkce transwell testu, který bude použit pro experiment v rámci této diplomové práce. Poslední podkapitola obsahuje stručný popis konfokálního mikroskopu, jež bude též použit při experimentu.

Druhá kapitola začíná definicí mesenchymálních kmenových buněk, je rozebrán jejich význam a funkce v organismu. Následně jsou uvedeny možnosti, ale i překážky ve využití buněk v medicíně. Způsobem migrace, na kterou se tato práce soustředí, je chemotaxe. Obsahem zbytku kapitoly je právě její obecný popis a také její smysl při správné migraci mesenchymálních kmenových buněk na místo nutnosti v organismu. S tím souvisí i objasnění pojmu komunikační osy SDF-1/CXCR4 a seznam zatím prozkoumaných možností, jak podpořit onu úspěšnou migraci buněk.

Následující kapitola obsahuje praktickou část práce. Jejím cílem je ověření teoretického předpokladu o zvýšení migrace MSC (mesenchymální kmenové buňky - mesenchymal stem cells) v reakci na působení chemotaktického gradientu způsobeného chemoatraktantem PDGF-BB. Experimenty jsou prováděny pomocí transwell testu, kolagenového gelu imitující extracelulární matrix a snímání probíhá fluorescenčním konfokálním mikroskopem. V rámci jednoho experimentu jsou zkoumány dvě různé koncentrace chemoatraktantu a jedna z jamek transwell testu je využita jako negativní kontrola. Všechny kroky pro přípravu experimentu jsou popsány v této kapitole. Součástí je i seznam potřebného vybavení, přístrojů a chemikálií pro experiment a jednotlivé protokoly.

Zpracování dat získaných z konfokálního mikroskopu je prováděno v programovém prostředí Matlab R2021a a použitý postup je součástí čtvrté kapitoly. Cílem je zjištění konfluence buněk před a po seškrábnutí gelu z vrchní strany membrány a zjištění počtu buněk migrovaných skrz membránu.

V poslední kapitole se nacházejí výsledky jednotlivých experimentů, jejich popis a zdůvodnění.

1 Migrace buněk v extracelulárním matrix

Buněčná migrace je nedílnou součástí mnoha biologických procesů probíhajících v živém organismu. Jedná se například o embryonální vývoj, tvorbu tkání, imunologickou odezvu, regeneraci či udržování homeostázy. Migrací se rozumí aktivní proces jednotlivých buněk nebo jejich skupin, kdy odpovědí na signály přijaté z okolí je pohyb. Jedná se o komplexní proces, který má mnoho způsobů přijímání různých typů signálů a odpovídajících reakcí na ně. Cílem je přemístění chtěných buněk po přesně dané trase do správného místa a ve správný čas. Způsobů jak tohoto docílit je mnoho a některé budou popsány v následujících odstavcích. [9], [11]

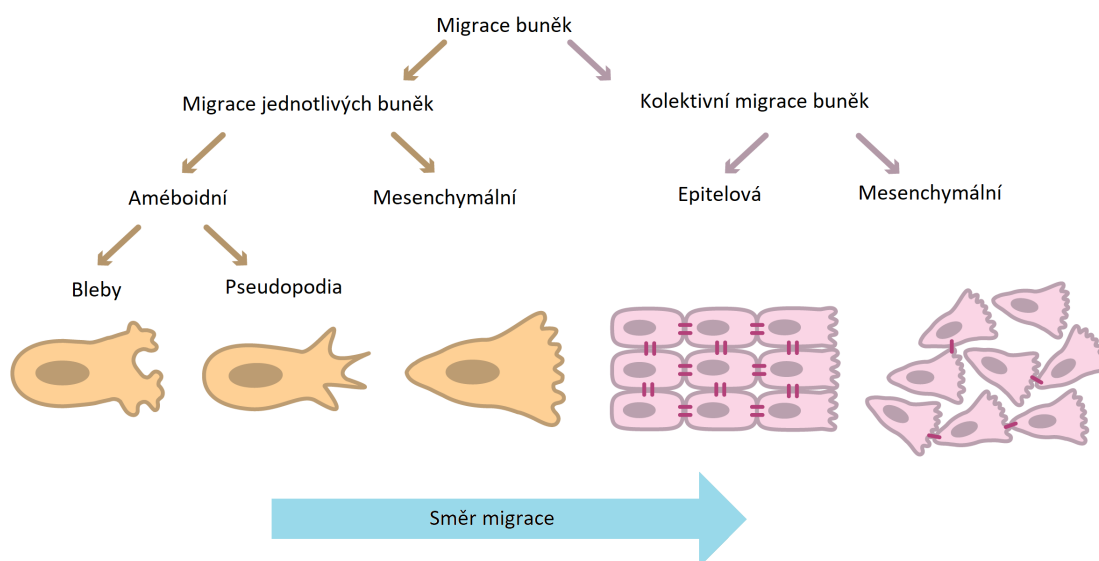
Extracelulární matrix je nebuněčnou komponentou všech tkání, kde vytváří fyzické prostředí obklopující buňky a zajišťuje tak určitou strukturu a také komunikaci. ECM (extracelulární matrix) můžeme rozdělit na dva základní typy: bazální membrána a intersticiální matrix. U bazální membrány se jedná o plochou laminární ECM skládající se převážně z kolagenu IV. typu, lamininu a proteoglykanů. Nachází se pod vrstvou epitelu a obklopuje orgány většiny živočišných organismů. Intersticiální matrix je pak obsažena v intersticiu, kde ho vyplňuje svou vláknitou sítí kolagenních a jiných molekul (fibronektin, elastin, laminin) s proteoglykany a vodou. ECM se ovšem může výrazně lišit svými biofyzikálními, biochemickými a topologickými vlastnostmi na základě tkáně, kterou obklopuje. Mění se tak její topografie, velikost pórů, velikost a orientace vláken, tuhost, elasticita nebo hustota ligandů. ECM tedy zastává mnoho funkcí: uchycení, vedení nebo omezení pohybů buněk nebo tkání, zprostředkování regulačních informací pomocí svých fyzikálních vlastností (tuhost) nebo svých chemických vlastností (lokální změna koncentrace jejích složek), zásobárna a zdroj signálních molekul (cytokiny). Pomocí těchto funkcí ovlivňuje ECM mnoho vývojových a buněčných procesů jako jsou například morfogenetické pohyby při gastrulaci a organogenezi, diferenciace kmenových buněk, růst či přežití buněk závislých na ukotvení a další. [13]

Aby mohly buňky přijímat a odesílat informace do svého okolí je nutné zajistit jejich fyzické spojení (adhezi), ať už s ECM nebo s další buňkou. Na příklad pouze na základě přijatých informací ohledně tuhosti okolního prostředí může být ovlivněna buněčná proliferace, diferenciace, chování nebo buněčná specifikace. Co se týče diferenciace mesenchymálních kmenových buněk, tuhé okolí navozuje vývoj kostní tkáně a tkání s podobnými vlastnostmi, měkké okolí vývoj nervové tkáně a podobných a okolí se střední tuhostí vyvolává vývoj svalové tkáně a podobných. [1] Vlastnosti adheze (rozložení, množství, síla a délka trvání) se liší mezi organismy, tkáněmi, vývojovými stádii a dokonce sousedícími buňkami. I přes tuto různorodost je nejčastějším způsobem vytvoření spojení buňky s ECM pomocí integrinů (membránové proteiny), které jsou přímo připojeny na cytoskelet buňky. Buňka se tak

může přichytit na vláknitou síť intersticiální matrix nebo přímo na bazální membránu. Spojení mezi buňkou a další buňkou může probíhat více způsoby, jedná se o těsná spojení (tight junctions), desmozomy a zonula adhaerens. Tato spojení jsou důležitá, aby ECM mohla ovlivňovat a komunikovat i s buňkami dále v tkáni, které na ni přímo nenaléhají (zvláště při embryogenezi). [13]

Interakce ohledně migrace funguje mezi buňkou a jejím okolím oboustranně. Buňka může přijímat fyzické podněty pomocí svých mechanických senzorů (otevřením kanálů, vystavení proteinu, odkrytí kryptických vazebných míst nebo navození biochemických signálních drah) a okamžitě na ně reagovat pomocí změn cytoskeletu, a tím i změnou svého tvaru a pohyblivosti. Během migrace buněčná adheze k ECM řídí cytoskeletální změny, které dále podněcují změny tvaru buněčné membrány, což souvisí s rozšiřováním buňky.

Tak jako se od sebe liší stavbou jednotlivé typy buněk, tak se od sebe liší i způsobem své migrace. Některé migrují celý svůj život a jiné migrují jen za specifických podmínek na konkrétní místo, některé migrují samostatně a jiné kolektivně. Na Obr. 1.1 můžeme vidět jednoduché rozdělení způsobů migrace buněk. [17]



Obr. 1.1: Rozdělení způsobů migrace buněk. Upraveno dle [17]

1.1 Migrace jednotlivých buněk

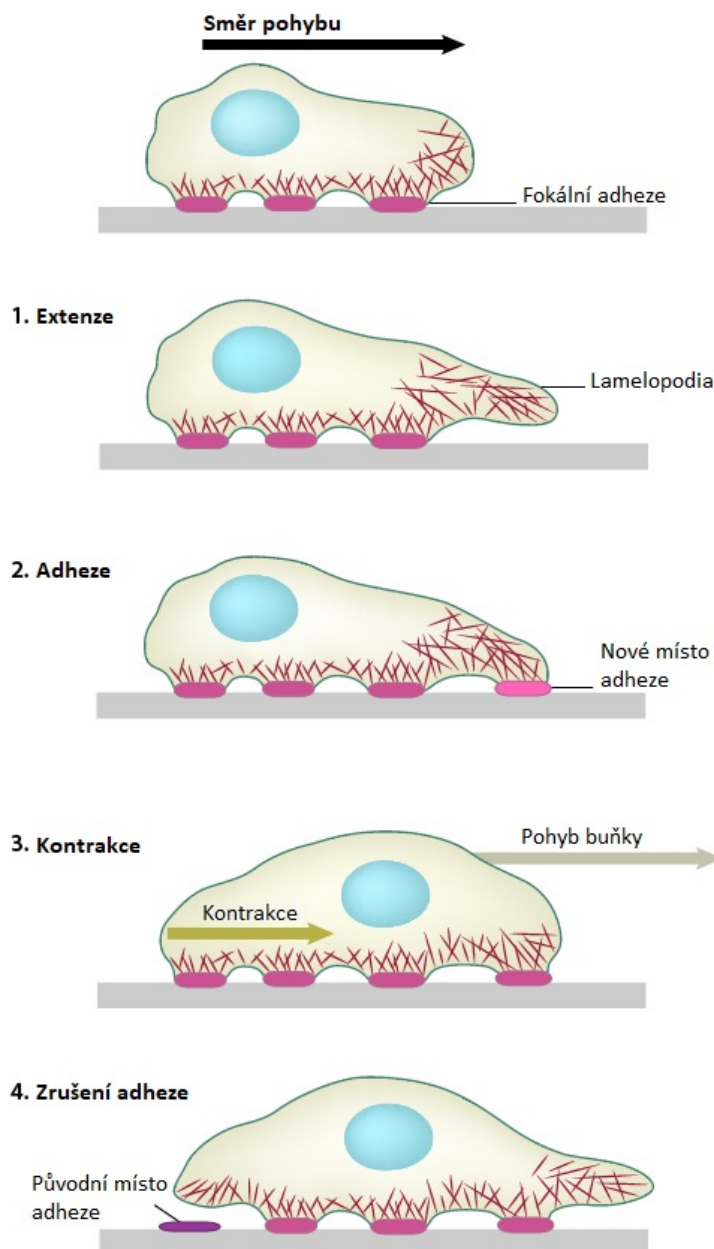
Tato podkapitola je zaměřená na migraci jednotlivých buněk, kterou je dále možno rozdělit na améboidní a mesenchymální. Buňky využívající améboidní migraci jsou elipsovitého až kulatého tvaru a při jejich pohybu nedochází, nebo pouze v malé

míře, k interakci s ECM. Buňky využívající při améboidní migraci bleby nedegradují ECM, pouze se pohybují mezi jejími komponentami díky schopnosti rychle měnit svůj tvar. V určitém místě povrchu buňky se membrána vyboulí, díky hydrostatickému tlaku se naplní cytoplazmou a začne se uvnitř tvořit aktinový kortex. Kontrakcí aktinového kortexu se bleb smrští zpět, membrána se vrátí do původního stavu a buňka začne migrovat. U druhého typu améboidní migrace dle schématu na Obr. 1.1 buňky využívají pseudopodia, konkrétně filopodia, která mají velmi slabé interakce s okolím a díky tomu jsou schopné pohybu. Améboidní migrace může být až několikanásobně rychlejší než mesenchymální, pohybují se díky ní na příklad leukocyty, hematopoetické kmenové buňky nebo dendritické buňky. Posledním typem migrace jednotlivých buněk je mesenchymální. Takto se pohybují tvarově protáhlé buňky, příkladem můžou být fibroblasty. K pohybu používají silné fokální adheze zprostředkované integriny, aktinomyosinovou kontrakci a degradaci ECM. [17], [18]

Po přijetí vnějších podnětů se buňka polarizuje, čímž určí své rozložení (která její část je přední a která zadní vzhledem ke směru pohybu). Následný postup, který je dále popsán, je názorně v krocích zobrazen na Obr. 1.2. Buňka použije místo adheze lokalizované v přední části buňky jako kotvu pro své výběžky (lamelopodia, filopodia), která jsou vytvořena polymerizující aktinovou sítí. Tyto výběžky aplikují tažnou sílu proti místu adheze na ECM a zároveň se kontrahuje zadní část buňky vpřed. Kombinací všech těchto procesů se dokáže buňka posunout v požadovaném směru, kde opět naváže s ECM nové adhezní spojení, přijme nové informace a na základě nich se zachová. S vytvořením nových adhezí v přední části buňky je třeba i přerušit adheze v zadní části, když se buňka kontrahuje. Adhezních míst na buňce je vždy více a z každého může dostávat mírně odlišné informace. Buňka je ovšem schopná tyto informace přijmout, zpracovat a vyhodnotit celkový gradient tuhosti, dle kterého určí směr, kterým se bude dále pohybovat. Tento způsob migrace buněk je též možné nazývat durotaxis. Existuje i způsob, kterým je tento pohyb ulehčen. Pomocí vytváření „tunelů“ skrz ECM matrixovými metaloproteinázami se vytvoří cesty, kterými mohou buňky migrovat snadněji bez většího odporu. Toto je dále možné podpořit změnou orientace a napětí extracelulárních vláken. [1], [11]

1.2 Kolektivní migrace buněk

Buňky ovšem nemusí migrovat pouze samy. Při kolektivní migraci se buňky pohybují v různých uskupeních, příkladem můžou být řetězce nebo listy. Jako skupina jsou buňky schopny reagovat na odlišné biochemické podněty a mechanické podněty jako je hustota buněk, soudržnost (síla adhezí) nebo stísněnost. Kolektivní migrace je zásadní pro vývoj organismu, tvarování tkání a hojení ran. Bohužel ovšem také hraje důležitou roli při progresi mnoha tumorů. Kolektivní migrace je ovšem komplikovaný



Obr. 1.2: Postup migrace buňky. 1. Extenze: polymerizace aktinových sítí a vytvoření výběžku. 2. Fokální adheze: uchycení výběžku k podkladu. 3. Kontrakce: tažnou silou adherovaných výběžků je buňka kontrahována vpřed. 4. Zrušení adheze: v zadní části buňky jsou přerušeny adheze a celá buňka se tak pohybuje vpřed. Upraveno dle [16]

a komplexní proces, který nelze zjednodušit pouze tak, že skupina nezávislých buněk se náhodou pohybuje stejným směrem a stejnou rychlostí. Kolektivní migrací je možné dosáhnout vyšší efektivity a v některých případech i získat specifické funkce, ale to vše závisí na správné komunikaci mezi buňkami. [1]

Dle Obr. 1.1 je možné kolektivní migraci buněk rozdělit na epitelovou a me-

senchymální. Nejdříve je pozornost upřena na epitelovou migraci, kde buňky mezi sebou vytváří silná spojení (adhezní, těsná či komunikační spojení). Díky těmto spojeníům jsou buňky schopny se navzájem ovlivňovat a vytvořit tak kolektivní polaritu. V rámci skupiny buněk je vytvořena určitá hierarchie, kdy buňky na okraji skupiny jsou označeny za vůdce, starají se tak o přijímání mechanických a biochemických podnětů z okolí a indukují tím směr pohybu celé skupiny. Proces migrace je velmi podobný procesu mesenchymální migrace jednotlivých buněk, kdy je využito fokálních adhezí, tažných sil, kontrakcí buňky a remodelace ECM. Experimentálně bylo dokázáno, že o kolektivní pohyb se nejvíce zaslouhují právě vůdcovské buňky na okraji skupiny, kde byly naměřeny největší tažné síly. S postupem do vnitra skupiny tažných sil rychle ubývá, ale celkově je rozložení sil heterogenní a kontinuálně se mění. Buňky uvnitř skupiny ovšem můžou přijímat informace z okolí a samostatně na ně reagovat. Může tak dojít k jejich zpomalení, pohybu odlišným směrem nebo vytvoření tak zvaného víru. Tím pádem je rozložení sil přes celou skupinu velmi dynamické a v čase proměnné. I přes tyto překážky je ovšem možné, aby se skupina pohybovala jedním konkrétním směrem. Částečně je to zajištěno vyššími silami u vůdcovských buněk. Dalším faktorem je vlna informací o celkové mechanice a polaritě, která je opakovaně přenášena od vůdcovských buněk do zbytku skupiny bez přerušení během celé migrace. Jednotlivé buňky tak spíše nasměrují své tažné síly ve směru celkové rychlosti a je tak zajištěno koordinované chování celé skupiny. Tento způsob kolektivní migrace ve směru maximálního napětí je nazýván plithotaxis. [1], [17]

Druhým typem kolektivní migrace je mesenchymální, kdy buňky nevytváří stálé spojení, ale spíše jen přechodné. V případě, že se srazí dvě polarizované mesenchymální buňky a adherují k sobě, způsobí to stažení jejich výběžků (lamelopodií, filopodií) a to vede ke ztrátě polaritity buněk. Tato srážka okamžitě zastaví jejich migraci a buňky se začnou repolarizovat v opačném směru, než byl jejich původní. Opětovná polarizace způsobí, že se buňky začnou znovu pohybovat, tentokrát směrem od sebe. Tento proces je nazýván kontaktní inhibice lokomoce (contact-inhibition of locomotion) a může probíhat mezi buňkami stejného nebo různého typu. Buňky se navzájem mohou ovlivňovat i pomocí vylučování specifického chemoatraktantu. Když se buňky vyskytují ve skupině a každá buňka vylučuje stejný chemoatraktant, vytvoří se lokální gradient (vyšší gradient s vyšší hustotou buněk), na který reagují ty buňky, které mají odpovídající receptory. Způsob migrace za vyšším či nižším chemickým gradientem se nazývá chemotaxe a je blíže popsána v podkapitole 2.1 na stránce 26. Pokud se tedy buňka vzdálí od skupiny kvůli kontaktní inhibici lokomoce, tak se může pomocí následování gradientu opět vrátit zpět. Tento způsob kolektivní migrace, kdy se střídá odpuzování a navracení buněk byl pozorovaný u mesenchymálních buněk. [17]

1.3 Metody sledování migrace buněk

Pohyb je základní vlastností živé buňky. Projevuje se už při počátku života organismu a dále v embryonálním vývoji, reakci imunitního systému, hojení ran i mnoha patologických procesech jako jsou metastázy rakoviny nebo zánět. Proto jsou metody *in vitro* studia pohybu buněk velmi důležité a neustále se rozvíjející. Jsou využívány v mnoha odvětvích biomedicínských studií, jako je na příklad výzkum rakoviny, imunologie, výzkum kardiovaskulárního systému, molekulární biologie nebo vývojová biologie. V následujících odstavcích je uvedeno několik základních metod pro sledování různého pohybu buněk při různých podmínkách ve 2D i 3D. [8]

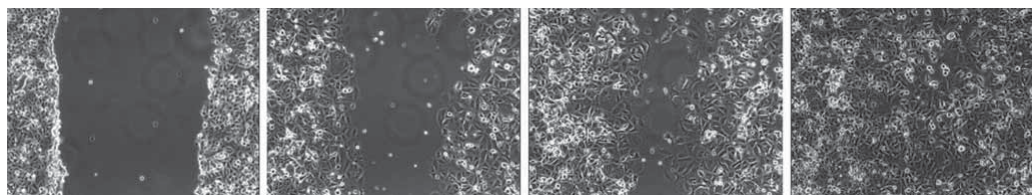
Wound healing assay

Jedná se o velmi jednoduchou a lehce dostupnou metodu dvourozměrného studia migrace buněk, která se soustředí na měření rychlosti migrace buněk jako celku. Základním principem je vytvoření dvou oddělených oblastí buněk a sledování jejich migrace ve snaze zacelit prázdný prostor mezi nimi. Metoda tak vlastně modeluje zacelování a hojení mechanicky vytvořených ran. K vytvoření onoho prostoru mezi buňkami existuje několik možných přístupů:

1. Scratch wound healing assay
2. Test pomocí zóny vyloučení
3. Snímání elektrické impedance buněk

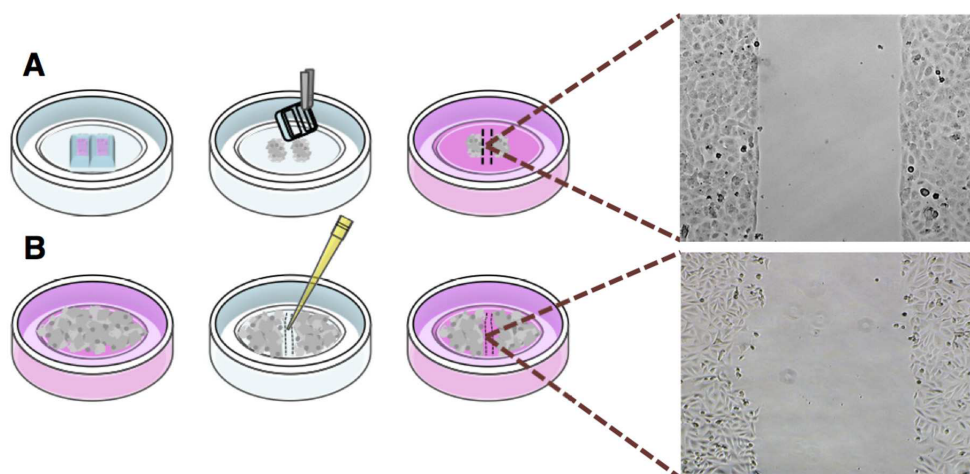
K provedení prvního testu scratch wound healing assay je třeba nakultivovat na misce souvislou vrstvu buněk do níž, jak už název napovídá, je mechanicky vytvořena rýha pomocí špičky pipety. Šířka rýhy se může měnit na základě toho, jaká pipeta je zvolena, často používanou je 200 μ l. Miska s buněčnou kulturou je následně vložena do inkubátoru a v pravidelných intervalech je pod mikroskopem pozorováno jak buňky migrují směrem ke středu ve snaze zacelit rýhu. Je možné i využití intervalového snímání mikroskopem nebo intervalového snímání fluorescenčním mikroskopem pro sledování dynamiky obarvených buněk nebo jejich určitých částí v průběhu migrace a adheze. Následné zpracování obrazů spočívá v hodnocení rychlosti kompletního zacelení rýhy, tato rychlost se totiž u buněk různého typu nebo buněk kultivovaných na různých substrátech (kolagen, Matrigel) liší. Příklad vývoje zacelování rýhy je ukázán na Obr. 1.3, kde je zobrazena rýha a její zacelování v čase 0 h, 24 h, 72 h a konečně 120 h. Je vidět, že po 120 hodinách je již prázdný prostor zcela zaplněn migrujícími buňkami. Vzhledem k tomu, že buňky jsou v průběhu experimentu v kultivačním médiu a většinu času i v ideálních kultivačních podmínkách, je zřejmé, že bude samovolně docházet k proliferaci buněk, a tím i k rychlejšímu zacelování rýhy. Výsledný čas by tím tak neodpovídal pouze schopnosti buněk migrovat,

ale byl by proliferací urychlen. Z toho důvodu jsou při některých experimentech do média přidávány látky pro inhibici proliferace (mitomycin C).



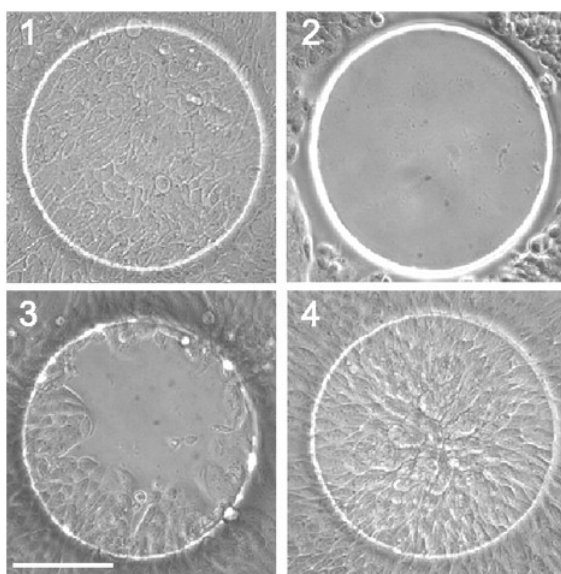
Obr. 1.3: Scratch wound healing assay - detail zacelování rýhy v čase 0 h, 24 h, 72 h a 120 h. [10]

Druhý typ testu se liší tím, že buňky samotné už jsou od začátku kultivovány odděleně, a poté je pouze odstraněna překážka a pozorována jejich migrace. Překážku je možné vytvořit několika způsoby a to pomocí mikrozátek, kapky biokompatibilního gelu, ohrádky nebo šablony. Všemi způsoby je docíleno přesné a vždy stejně velké zóny vyloučení, která je následně zaplňována. Test pomocí zóny vyloučení má oproti prvnímu testu nižší variabilitu, a tím pádem se zvyšuje reprodukovatelnost, spolehlivost a přesnost jeho výsledků. Výhodou scratch wound healing assay ovšem zůstává jednoduchost provedení a nízká cena testu. Obr. 1.4 zobrazuje rozdíl postupu při testu pomocí zóny vyloučení a scratch wound healing assay. U možnosti A je použita šablona při kultivaci buněk, poté je odstraněna a je možné si všimnout, že vytvořená rýha je velmi přesná. U možnosti B je k vytvoření rýhy použita špička pipety a výsledný tvar rýhy není tak pravidelný a přesný.



Obr. 1.4: Rozdíl postupu při testu pomocí zóny vyloučení (A) a scratch wound healing assay (B). Upraveno dle [9]

Metoda snímání elektrické impedance buněk se od prvních dvou liší tím, že prázdný prostor mezi buňkami je tvořen elektrickým signálem a je jím sledována i následná migrace. Na elektrodu je přiveden elektrický proud, který naruší souvislou vrstvu buněk a vytvoří tak prázdný prostor o přesně definované velikosti. Migrující buňky postupně zaplňují prázdný prostor na elektrodě, a tím zvyšují elektrický odpor, jehož měřením jsou získány informace o rychlosti migrace. Na Obr. 1.5 je zobrazen vývoj buněčné kultury v průběhu testu. V první fázi je vrstva buněk ještě neporušena, ve druhé je zobrazena těsně po vytvoření prázdného prostoru pomocí elektrického proudu, ve třetí fázi je zachyceno zacelování po 1 hodině a poslední fáze úplného zacelení je získána po 3 hodinách.



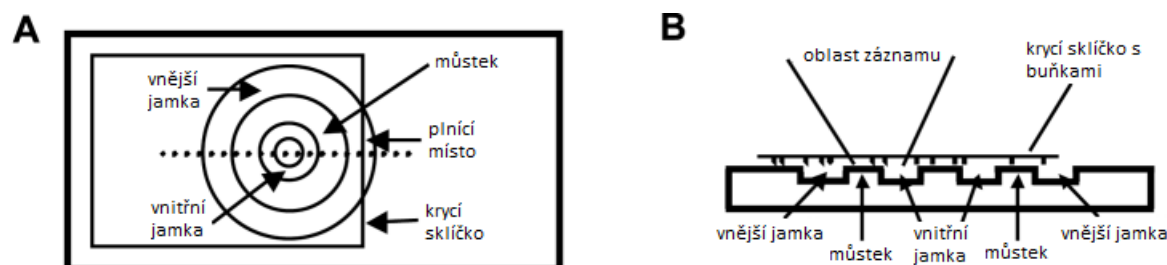
Obr. 1.5: Zacelování prázdného prostoru vytvořeného elektrodou. [11]

Limitací wound healing assay metod je nutnost použití adherujících buněk, bez této vlastnosti není možné testy provádět. Další nevýhodou je dvourozměrnost testů, kde tudíž nelze sledovat buněčnou chemotaxi. [8], [9], [10], [11]

Dunnova komůrka

Jedna z metod pro studium chemotaxe buněk je Dunnova komůrka, jejíž schéma je zobrazeno na Obr. 1.6. V plastové destičce překryté krycím sklíčkem se nachází dvě jamky ve tvaru soustředných kružnic mezi nimiž je přepážka mírně snížena a vytváří se tak mikrofluidní můstek. Do vnější jamky jsou vneseny buňky a do vnitřní chemoatraktant, který v Dunnově komůrce vytváří chemotaktický gradient. Komůrka je umístěna pod mikroskop s intervalovým snímáním, kde se v reálném čase sleduje migrace buněk po směru gradientu. [10], [11]

Na stejném principu jako Dunnova komůrka funguje i migrační test v kapilární komůrce, kde jsou opět použity dvě komůrky (jedna pro buňky, druhá pro chemoatraktant), ale jsou uspořádány radiálně. Další variantou je vytvoření 3D chemotaktického gradientu v gelu (např.: agarózovém) a pozorování v něm chemotaxe buněk. [11]



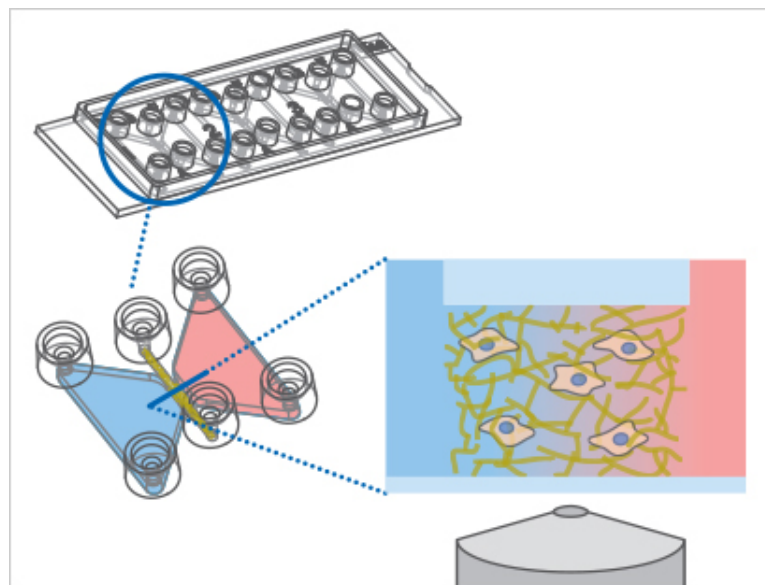
Obr. 1.6: Schéma Dunnovy komůrky (A) a jejího průřezu (B). Upraveno dle [12]

μ -Slide Chemotaxis

μ -Slide Chemotaxis obsahuje tři paralelní komůrky pro provádění tří nezávislých experimentů. Každá komůrka se skládá ze dvou nádržek, které jsou propojené úzkým kanálkem. Pro μ -Slide Chemotaxis jsou vhodné adherentní i neadherentní buňky a je možné pozorovat jejich chemotaktické chování na 2D povrchu či ve 3D gelu. Schéma metody je viditelné na Obr. 1.7. Díky tomu, že chemotaktický gradient je vytvořen velmi rychle a zůstává stabilně lineární dlouhou dobu, je možné sledovat rychle migrující buňky (už po 30 minutách), ale i ty pomalu migrující (v rámci dvou a více dnů). Výhodou této metody je vcelku jednoduchá příprava experimentu. Nejdříve jsou do kanálku nasazeny buňky a nechány vhodnou dobu inkubovat pro vytvoření homogenního rozložení. Celá komůrka je naplněna kultivačním médiem a do jedné z nádržek je přidán chemoatraktant. Díky nerovnoměrné aplikaci chemoatraktantu se v komůrce vytvoří chemotaktický gradient a buňky na něj začnou reagovat. Jejich chování je pozorováno pomocí mikroskopu v oblasti kanálku. Metoda μ -Slide Chemotaxis může být upravena také tak, že místo chemoatraktantu jsou do nádrže vloženy buňky, které chemoatraktant produkují a je možné sledovat přímo reakci jednoho druhu buněk na jiný. [14]

Transwell assay

Migrační test transwell assay je jedním z nejpoužívanějších *in vitro* testů ke sledování migrace buněk, který se zakládá na systému Boydenovy komůrky. Pomocí něho je prováděna analýza migrace buněk skrz porézní membránu na základě chemotaktického gradientu chemoatraktantu, méně často také na základě elektrického



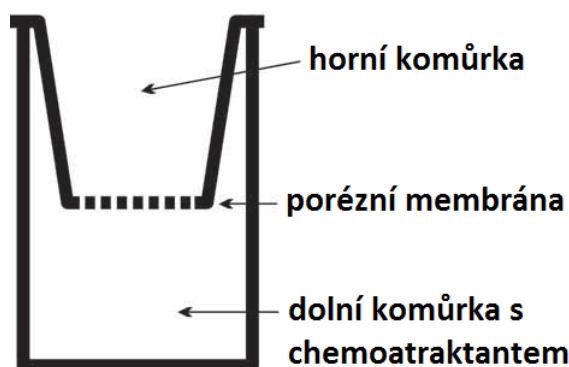
Obr. 1.7: Schéma μ -Slide Chemotaxis (konkrétně 3D experiment migrujících buněk v gelu). [14]

gradientu nebo tuhosti matice. Dnes se využívají tři základní varianty tohoto testu pro sledování nejen migrace, ale i invaze, extra- a intravazace:

1. Transwell migration assay
2. Transwell invasion assay
3. Transwell transendothelial migration assay

Transwell migration assay, neboli transwell migrační test, je základní variantou, která je dále upravována. Jedná se o jednorázovou plastovou vícejamkovou destičku, kde se každá jamka skládá ze dvou komůrek oddělených membránou (každá jamka odpovídá svou konstrukcí jedné Boydenově komůrce). V první komůrce se nachází roztok se sledovanými buňkami, ve druhé chemoatraktant. Schéma jedné jamky testu je vidět na Obr. 1.8. Použití konkrétního chemoatraktantu a jeho koncentrace se může lišit na základě prováděného experimentu. Často se jedná o chemokiny, růstové faktory, lipidy, proteiny nebo nukleotidy. Velikost pórů v membráně záleží na velikosti sledovaných buněk. Pokud by na příklad byly použity příliš malé buňky, mohly by procházet skrz póry náhodně a nemuselo by se jednat o kontrolovanou migraci. Pokud by naopak byly buňky příliš velké, nemohly by póry projít i kdyby na ně působil pozitivní chemotaktický gradient. Proto je nutné znát velikost sledovaných buněk, použít správnou velikost pórů a zvolené nastavení testovat. Po přidání všech potřebných roztoků je transwell test inkubován (doba inkubace opět závisí na použitých buňkách a chemoatraktantu). Při sledování neadherentních buněk dojde k jejich migraci skrz membránu a rozptýlení v médiu chemoatraktantu. Pro zjištění jejich počtu je následně možné využít na příklad průtokový cytometr. Pokud se

ovšem jedná o adherentní buňky, ty které migrovaly skrz membránu se usadí na její opačné straně a ke zjištění počtu migrovaných buněk je třeba membránu zobrazit pomocí mikroskopie. Buňky jsou v tomto případě často barveny krystalovou violetí nebo fluorescenčními barvivy pro jejich zvýraznění a ulehčení jejich detekce. [7], [8]



Obr. 1.8: Schéma jamky transwell testu (neboli Boydenovy komůrky). [10]

Zatímco transwell migrační test měří pouze schopnost buněk reagovat na chemotaktický gradient, transwell invasion assay umožňuje kromě chemotaxe zkoumat i invazi buněk skrz extracelulární matrix (proces častý u metastázujících nádorových buněk nebo embryonálního vývoje). Tento test je upraven tak, že na membránu je přidána vrstva materiálu, který napodobuje extracelulární matrix uvnitř organismu. Často je využíván kolagen, Matrigel a další. Hlavním důvodem využití tohoto testu je právě jeho komplexnost, kdy se svými podmínkami blíží *in vivo* podmínkám a modeluje tak přesněji pohyb buněk. Mimo pouhé sečtení buněk, které se dostaly do druhé komůrky testu je možné extracelulární matrix z komůrky vyjmout a pomocí konfokální mikroskopie blíže zkoumat chemotaxi buněk ve 3D projekci. Dalším rozšířením může být obarvení buněk fluorescenčními barvivy a použití fluorescenční mikroskopie. [7], [8], [10]

Třetím rozšířením transwell testu je transwell transendothelial migration assay, kdy je na membránu přidána jednodatá vrstva endotelových buněk. Tento typ buněk má velmi těsné spojení a prostor mezi nimi je vyplněn extracelulární matrix, kterou produkují. Tímto testem je sledována schopnost migrujících buněk proniknout skrz endotel. Proces proniknutí je nazýván extravazace a v organismu je pozorován na příklad na buňkách přiváděných krevním řečištěm k postiženému místu, kde se zachytí na endotelu, proniknou jím do intersticia a začnou působit. Pokud by byla endotelová vrstva buněk aplikována na membránu z druhé strany (buňky by musely nejdříve projít membránou a následně endotelovou vrstvou), vznikl by model intravazace (pronikání buněk skrz endotel do cév). [7]

Kromě již zmíněných upravení transwell testu je možné měnit i jiné parametry a rozšiřovat tak spektrum proveditelných experimentů. Mezi ony parametry se řadí na příklad použití různých chemoatraktantů. Test se stejnými buňkami je proveden několikrát, pokaždé s jiným chemoatraktantem nebo jeho různou koncentrací a výsledky migrace/invaze/extravazace/intravazace jsou srovnány. Dále je možné se stejným chemoatraktantem testovat více druhů buněk a sledovat jejich rozdílné chování. Pro bližší molekulární analýzu se také pomocí testu můžou od sebe oddělit více a méně invazivní buňky. V neposlední řadě je možnost buňky různými způsoby upravit a změnit tak jejich chování. Jedná se především o genový knockdown (snížení exprese určitého genu), transfekci (přenos DNA do buněk) a použití protilátek pro zkoumání změny migrace a invaze nebo o testování působení léků na buňky a jejich následnou invazi. [7]

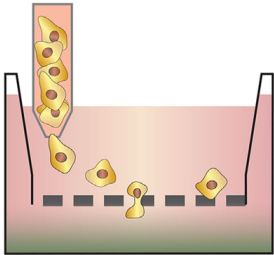
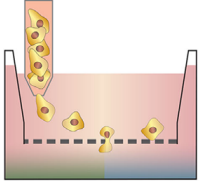
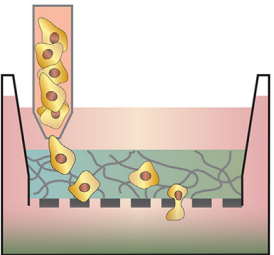
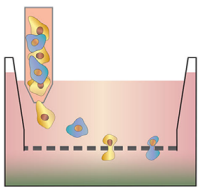
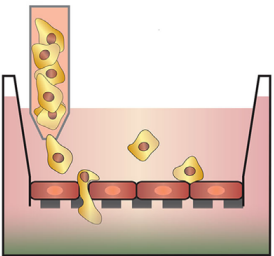
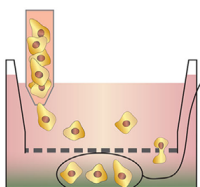
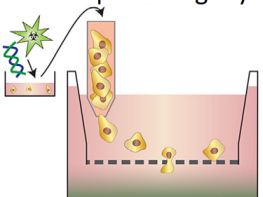
Grafické znázornění třech základních variant transwell testu i další úpravy jeho parametrů je zobrazeno na Obr. 1.9.

Limitací transwell testů zůstává omezení kontinuálního sledování buněk, kde nestačí konvenční mikroskopie a proces je velmi složitý. Dalším omezením je nutnost dodržet při přípravě experimentu několik kroků, aby bylo dosaženo co nejpřesnějších výsledků. Za prvé buňky různých druhů se mohou lišit rychlostí migrace, proto je potřeba pomocí několika přípravných testů zjistit časový rámec inkubace, který bude následně použit. Za druhé buňky různých druhů reagují odlišně na různé chemoatraktanty, proto je třeba během přípravných testů vyzkoušet rozličné kombinace a vybrat tu nejvhodnější pro daný experiment. Za třetí při použití extracelulární matrix v transwell invasion assay je třeba ověřit, že její povrch je homogenní, aby nedocházelo k ovlivňování výsledků. I přes všechny tyto omezení se stále jedná o lehce dostupný a proveditelný test, který je vhodný pro širokou škálu studií. [8]

1.4 Konfokální mikroskopie

Při experimentu v rámci této diplomové práce byl využit konfokální mikroskop. Následuje proto krátký popis jeho konstrukce a funkce.

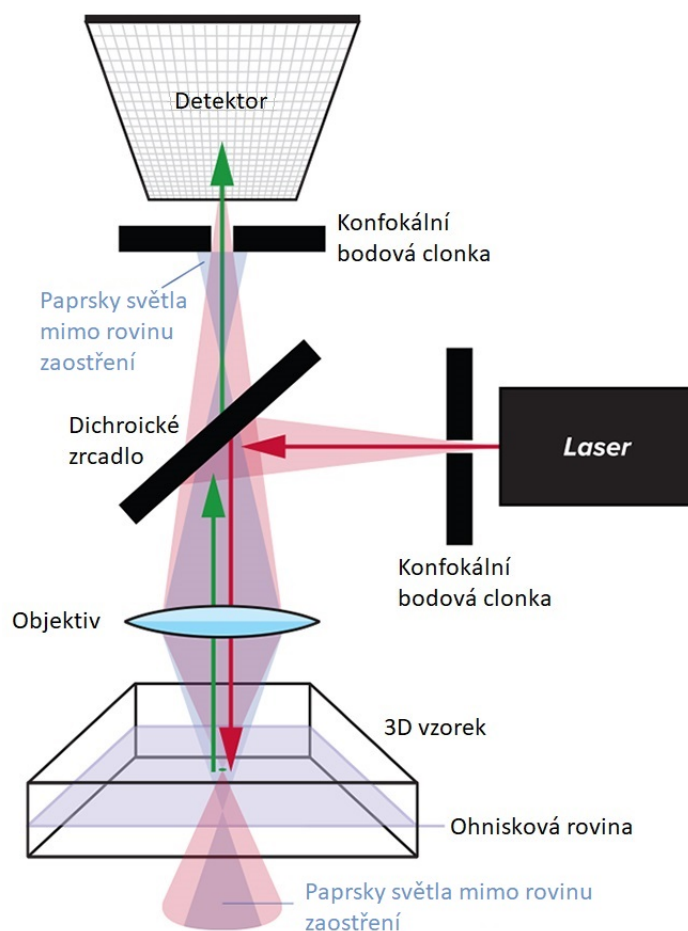
Bodovým zdrojem světla u laserového rastrovacího konfokálního mikroskopu je laser fokusovaný na první konfokální bodovou clonku. Dále prochází paprsek objektivem, kde je na závěr fokusován na konkrétní bod v pozorovaném vzorku. Velikost zaměřeného bodu je dána rozlišovací schopností objektivu. Na tentýž objektiv dopadá sekundární záření, kterým je světlo odražené a rozptýlené od vzorku či fluorescenční záření v případě fluorescenční modifikace mikroskopu. Sekundární záření je pomocí děliče paprsků přivedeno na druhou konfokální bodovou clonku, která zajistí, že na detektor (fotonásobič nebo CCD kameru) dopadne pouze záření pocházející ze zaostřené roviny vzorku. Díky této prostorové filtraci záření neobsahuje

Varianty testu	Parametry	Výstupy
Migration assay 	Srovnání chemoatraktantů 	Relativní účinnost chemoatraktantů na migraci / invazi / metastázi
Invasion assay 	Srovnání typů buněk 	Relativní schopnost migrace / invaze / intravazace různých typů buněk
Transendothelial migration assay 	Separace invazivních buněk 	Možnost samostatně kultivovat invazivní a neinvazivní buňky Molekulární analýza rozdílů mezi více a méně invazivními buňkami
	Působení léků / Manipulace s geny 	Účinek genového knockdownu / virové transfekce / působení protilátek na invazivitu Účinnost potenciálních léků pro snižování invaze Vliv biologických faktorů na invazivitu

Obr. 1.9: Ukázky variant transwell testu. Upraveno dle [7]

výsledný obraz rozmazané pozadí, a je tím výrazně zvýšena jeho kvalita. Jedná se pak o velmi ostrý optický řez vzorkem a s posunem vzorku ve vertikální rovině je možné snímat řezy v různých hloubkách vzorku. Obraz celého vzorku v zaostřené rovině je získán rastrováním - posouváním laserového paprsku bod po bodu přes celý vzorek. Rastrování může být provedeno třemi základními metodami: rozmítání paprsku pomocí zrcadel, posouváním vzorku pod objektivem nebo posouvání objektivu nad vzorkem. Schéma základní stavby konfokálního mikroskopu je zobrazeno na Obr. 1.10. [22]

Pro experiment popsáný v praktické části této diplomové práce bude použit konfokální mikroskop Leica TCS SP8 X. Tento mikroskop se vyznačuje tím, že jako zdroj bílého světla používá pulzní laser. Tento laser umožňuje nastavení až 200 různých vlnových délek v rozsahu od 470 do 670 nm s 1nm krokem, díky tomu vyhovuje



Obr. 1.10: Schéma konfokálního mikroskopu. Upraveno dle [24]

širokému počtu fluorescenčních barviv a je vhodný pro unikátní kombinaci excitace a detekce. Se systémem AOBS je mikroskop také schopen používat simultánně až 8 vlnových délek bez dichroických zrcadel, zároveň je rychle přepínat a ladit. Mikroskop obsahuje velice citlivé hybridní detektory s vysokým dynamickým rozsahem, které v kombinaci s bílým laserem snižují fototoxicitu na minimum a zajišťují až 200 milionů kombinací excitace a emise. [23]

2 Mesenchymální kmenové buňky

Mesenchymální kmenové buňky (někdy nazývané i mesenchymální stromální buňky) byly poprvé izolovány v roce 1970 ze suspenzí kostní dřeně a sleziny [2]. MSC (mesenchymální kmenové buňky - mesenchymal stem cells) byly původně popisovány jako adherentní populace buněk podobné fibroblastům, které jsou schopné osteogenní diferenciace. Následně bylo prokázáno, že se vyskytují ve všech tkáních lidského těla, které jsou schopné regenerace a mají vlastnost multipotence (schopnost buňky se diferencovat do mnoha typů buněk). Ucelenou definici MSC vytvořila organizace the International Society for Cellular Therapy a skládá se ze tří kritérií:

1. MSC musí být schopny adherovat k plastovému povrchu a vytvářet kolonie za standardních kultivačních podmínek.
2. MSC musí mít povrchové markery CD71, CD73, CD90 a CD105. Naopak nesmí mít CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 α a kostimulační molekuly CD80 a CD86. Také musí vykazovat nízkou úroveň exprese MHC glykoproteinu I. třídy.
3. MSC musí mít schopnost diferenciovat *in vitro* na osteoblasty, chondrocyty a adipocyty.

Tyto charakteristiky se obecně vztahují k buňkám získaným z kostní dřeně, ale buňky z jiných tkání se můžou mírně lišit. Jedná se tak o velmi heterogenní skupinu, která je ovlivňována vnitřními i vnějšími faktory. Proces diferenciace *in vitro* vyžaduje specifické růstové faktory a chemické mediátory. Kromě toho záleží i na hustotě a uspořádání buněk, věku dárce, fázi kultivace a pasážování, použitých elektrických a mechanických zásahů nebo vlastností podkladu. Proto existuje mnoho různých protokolů ke správné kultivaci MSC. [3]

MSC jsou klíčovou součástí pojivové tkáně, která zajišťuje strukturální a funkční podporu parenchymu mnoha orgánů. Nyní je již známo, že udržování a oprava parenchymu je zprostředkovávána MSC, které diferencují na konkrétní typy buněk, a je tím tak vytvořena určitá hierarchie. Kromě opravy a regenerace parenchymu orgánů mají MSC také funkce imunosupresivní, antibakteriální a antifibrotickou. [2] Jsou tím pádem klíčem k udržování homeostázy a hematopoézy v kostní dřeni. MSC vylučují mnoho různých růstových faktorů, cytokinů a adhezních molekul, pomocí kterých ovlivňují parakrinní zanícené nebo degenerující tkáně a podporují tak jejich opravu. [3]

Získávání MSC pro experimentální účely je v dnešní době bez větších etických problémů, protože je možné je odebírat z kostní dřeně nebo tukové tkáně, které jsou lehce dostupné. Dále jsou získávány z periferní krve, pupeční šňůry, placenty a jiných tkání. Výhodou je také krátká kultivační doba, za kterou se počty MSC dostatečně rozšíří pro klinické studie.

V neposlední řadě je třeba zmínit i to, že oprava orgánů nemusí být prováděna MSC, které se přímo v něm nachází. MSC z kostní dřene a dalších tkání můžou být přivolané na místo nutnosti (např.: zranění) a zde diferencovány na potřebné typy buněk. Díky všem těmto vlastnostem jsou MSC skvělými kandidáty pro experimentální účely (jsou odebrány z lehce dosažitelných tkání a jsou snadno kultivovány) a také pro terapii kmenovými buňkami. Tento typ léčby se stále zkoumá a rozvíjí. [4] Její využití by se našlo u autoimunitních onemocnění, sepsí nebo u transplantací. Základní otázkou zůstává imunomodulační vlastnost MSC (vlastnost ovlivňující obranyschopnost organismu), která se liší u MSC získaných z různých tkání a kultivovaných v různých kultivačních podmínkách. Díky této charakteristice jsou buňky schopné obejít imunitní systém a působit v potřebném místě bez omezení nebo naopak ovlivnit imunitní odpověď organismu (např.: potlačit zánětlivou reakci). Buňky vykazují odlišné povrchové markery, různou sekreci cytokinů, délku telomer nebo metylační vzory. Komplexní porozumění dále narušuje zjištění, že zmražené buňky mají sníženou imunomodulační vlastnost oproti kontinuálně kultivovaným buňkám. Poločas života MSC je krátký a buňky neprojdou plicní kapilární sítí po intravenózním podání, což opět znemožňuje dlouhodobý imunomodulační účinek (zvláště u transplantací). Výzkum se také zabývá použitím pouze fragmentů MSC (částí membrány), tepelně inaktivovaných MSC nebo dokonce apoptických buněk získaných z tukové tkáně. Tyto alternativní možnosti využití MSC prokázaly určité zachování některých vlastností živých buněk, i když výsledky studií jejich aplikace se různí (některé dokonce prokázaly, že použití apoptických buněk bylo účinnější). Za největší nebezpečí terapie kmenovými buňkami by mohla být označena možnost vzniku nádoru, které by mohlo být v budoucnosti vyřešeno právě použitím jiných forem MSC. [3], [6] Velmi důležité proto je správné dávkování a zacílení buněk při vpravování do těla pacienta. Cílem je co nejvyšší využití potenciálu buněk spolu s minimalizací vedlejších účinků. Špatné podání MSC může zapříčinit vaskulární obstrukci a ta následně může vést k dušnosti, bolesti nohou nebo narušení diferenciace. [4], [5]

2.1 Chemotaxe MSC buněk

V předchozích podkapitolách již byly zmíněny některé druhy migrace, kterých jsou buňky v organismu schopny. Popsána byla tzv. durotaxis (ve směru gradientu tuhosti) a plithotaxis (ve směru maximálního napětí). Ovšem způsob migrace, který je pro tuto diplomovou práci a experiment popsáný v praktické části zásadní je chemotaxe.

Chemotaxe je řízená migrace buněk určitou chemickou látkou. Pozitivní chemotaxí je nazýván pohyb buněk ve směru zvyšujícího se chemického gradientu způ-

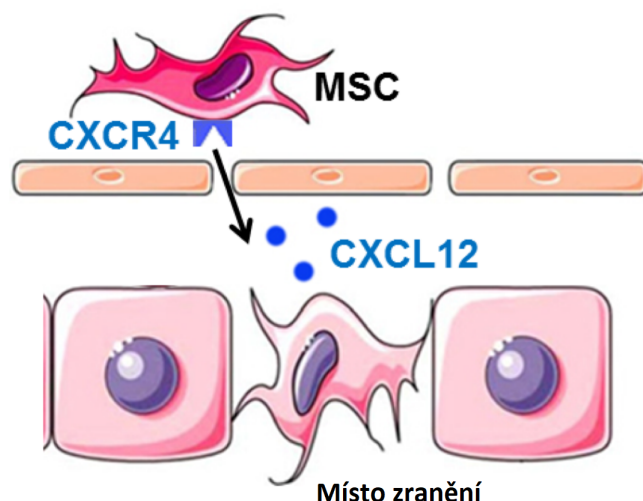
sobeného chemoatraktantem a naopak negativní chemotaxe znamená pohyb buněk v opačném směru způsobený chemorepulentem. Tyto látky indukující chemotaxi můžou být chemokiny, chemokinové receptory, růstové faktory nebo receptory růstových faktorů. [25], [26]

Chemotaxe hraje důležitou roli v mnoha fyziologických procesech jako je reakce organismu na zánět či vývoj orgánů. Na druhou stranu je možné ji pozorovat i u progresu rakoviny, kdy v průběhu metastatického procesu vede chemotaxe buněk k jejich šíření a invazi do zbytku organismu. S tím souvisí i angiogeneze, která je esenciální pro vývoj orgánů, ale bohužel také podporuje růst tumorů. [25]

Jak již bylo zmíněno dříve v této kapitole, mesenchymální kmenové buňky díky svojí vlastnosti multipotence jsou významné při regeneraci parenchymu orgánů. Dále imunosupresivní, antibakteriální a antifibrotickou funkcí ovlivňují reakce organismu na zánět či zranění. Všechny procesy, kterých se MSC v organismu účastní, jsou stále nedostatečně prozkoumány, a proto v dnešní době probíhá mnoho experimentů zabývajících se výzkumem chování a důležitosti MSC. Velkou motivací zůstává možnost širokého využití terapie kmenovými buňkami v různých odvětvích medicíny. Důležitou otázkou zůstává jakým způsobem je regulována chemotaxe MSC na konkrétní místo nutnosti, tento mechanismus je také označován jako *homing*. Proces *homing* je ovlivňován řadou mediátorů a receptorů. Několika studiemi bylo prokázáno, že jedním z nejdůležitějších chemoatraktantů je chemokinový faktor 1 odvozený od stromálních buněk (SDF-1), který je na místě nutnosti upregulovaný a ovlivňuje tak pozitivně chemotaxi MSC exprimujících receptor CXCR4. Zjednodušené schéma komunikační osy SDF-1 (faktor 1 odvozený od stromálních buněk - the stromal cell-derived factor 1)/CXCR4 je znázorněno na Obr. 2.1. Fungování komunikační osy SDF-1/CXCR4 bylo zjištěno u poškozených orgánů jako je mozek, kostní tkáň, ledviny, srdce či játra. [5]

2.2 *Homing* a komunikační osa SDF-1/CXCR4

V případě vážnějšího poškození tkáně dojde k zánětlivé reakci a proces fagocytózy nekrotizujících buněk vede k uvolnění různých mediátorů (IFN- γ (Interferon γ), TNF- α (faktor nádorové nekrózy α - tumor necrosis factor α), IL-1 (Interleukin 1)), chemokinů, volných radikálů a dalších látek. Díky komunikační ose SDF-1/CXCR4 a jiným způsobům začnou MSC lokalizované v blízkém okolí nebo v kostní dřeni migrovat způsobem chemotaxe do místa poškození. Prvním krokem procesu *homing* je vytvoření spojení buňky kolující krevním řečištěm s exprimovaným receptorem a buňky endotelu, na které je vystaven příslušný koreceptor. Dalšími kroky dojde k extravazaci buňky skrz endotel a dále migraci extracelulární matrix do místa poškození. V tomto místě následně MSC mimo jiné blíže kooperují s různými typy



Obr. 2.1: Schéma procesu *homing*, kdy na místě zranění je upregulován SDF-1 (CXCL12) a slouží jako chemoatraktant pro MSC, které na svém povrchu exprimují receptor CXCR4. Upraveno dle [5]

stromálních a zánětlivých buněk k dosažení opravy poškození a regenerace tkáně. MSC jsou schopné produkce široké škály růstových faktorů jako jsou TGF- β (transformující růstový faktor β - transforming growth factor β), HGF (hepatocytární růstový faktor - hepatocyte growth factor), EGF (epidermální růstový faktor - epidermal growth factor), FGF (fibroblastový růstový faktor - fibroblast growth factor), VEGF (vaskulární endotelový růstový faktor - vascular endothelial growth factor), PDGF (destičkový růstový faktor - platelet-derived growth factor), IGF-1 (inzulínu podobný růstový faktor 1 - insulin-like growth factor 1) nebo SDF-1. Tyto faktory poté pozitivně ovlivňují vývoj progenitorových buněk tkáně, fibroblastů a endotelových buněk, což má za následek podporu regenerace a opravy tkáně. [3]

SDF-1 je také nazýván jako CXCL12, protože je kódován na lidském desátém chromozomu stejnojmenným genem. Jedná se o velikostí malý chemotaktický cytokin, jež je často vyvoláván prozánětlivými podněty jaké zapříčiňují TNF- α nebo IL-1 [3]. Pro navázání receptoru je důležitý N-konec SDF-1 a hlavním receptorem pro tento faktor je CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4). Jedná se o molekulu složenou z 352 aminokyselin, která po navázání faktoru přenáší do buňky vícero signálů, které mohou následně vést k buněčné proliferaci, chemotaxi, migraci, apoptóze, přežití či diferenciaci. [27] CXCR4 je ovšem převážně exprimován v cytoplazmě buněk a pouze malá část na membráně. S tím souvisí i fakt, že s delší kultivační dobou je hodnota receptoru na membránách buněk snižována. Pro úspěšnější *homing* MSC v dostatečném množství při terapii kmenovými buňkami je proto nutné buňky vhodně připravit. Za zvyšováním exprese CXCR4 na membráně stojí

řada cytokinů. Jedním z nich je na příklad transformující růstový faktor TGF- β 1. Experimentálně bylo zjištěno, že při záměrném zavádění TGF- β 1 do MSC došlo ke zvyšování migrační schopnosti buněk na základě upregulace receptoru CXCR4. [28] Dalším ze zkoumaných faktorů je HIF-1 α (hypoxicky inducibilní faktor 1 α - hypoxia-inducible factor 1 α). Jedná se o stěžejní transkripční faktor, který pomáhá regulovat odpověď buněk na hypoxii a několik proteinů s ním přímo interaguje pro snižování či zvyšování jejich funkce. Výzkumem bylo dosaženo závěru, že pokud jsou MSC kultivovány v hypoxických podmínkách, dochází ke zvýšené expresi HIF-1 α , což vede k upregulaci SDF-1, a tím i ke zvýšené migraci buněk. [29], [31] Také vystavení MSC molekulám jako je kyselina valproová (VPA) či desulfoferrodoxin (DFX) zvyšuje expresi CXCR4 receptoru a jsou tak produkovány spolehlivější buňky pro terapii kmenovými buňkami [30].

Pomocí produkce SDF-1 stromálními buňkami v kostní dřeni je také regulován pohyb buněk dovnitř a ven z prostředí kostní dřene. SDF-1 je ovšem produkován i stromálními buňkami tumorů, což má mimo jiné za následek přivedení MSC, a tím podporu angiogeneze a růst tumoru. [27]

Kvůli dostupnosti byla jako chemoatraktant pro praktickou část této diplomové práce zvolena jedna z isoform PDGF - PDGF-BB (destičkový růstový faktor BB - platelet-derived growth factor-BB). Jedná se o dimerní protein, který se váže na receptory vystavené na povrchu MSC (α -PDGF receptor, β -PDGF receptor) a účastní se tak vývoje a remodelace různých typů tkání. Kromě silného stimulačního efektu k migraci buněk je PDGF-BB také mitogenem a má schopnost podporovat angiogenezi, proliferaci, diferenciaci a přežití buněk. Díky všem těmto vlastnostem se řadí k těm nejdůležitějším regulačním látkám při regeneraci tkání. S PDGF-BB jako s chemoatraktantem MSC se již pracuje v mnoha preklinických i klinických testech. [36], [38]

Závěrem zůstává, že stále není úplně porozuměno způsobu migrace mesenchymálních kmenových buněk a s tím je právě spojený jejich úspěšný *homíng* na potřebné místo v organismu v rámci terapie kmenovými buňkami. Tato oblast pořád zůstává nedostatečně prozkoumána, ale díky výraznému potenciálu využití v medicíně je předmětem mnoha studií.

3 Praktická část práce

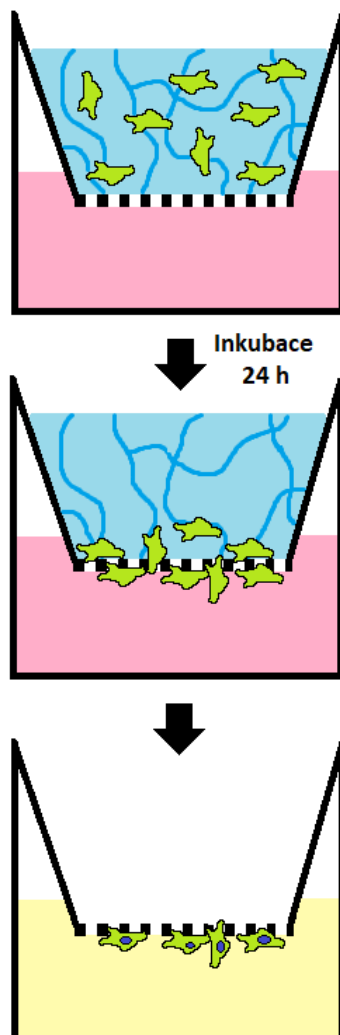
V teoretické části této diplomové práce byly blíže popsány mesenchymální kmenové buňky a jejich migrace na principu chemotaxe. V experimentech je snaha se co nejvíce přiblížit podmínkám jakým jsou buňky vystaveny v živém organismu. Cílem praktické části je tedy sledování migrace mesenchymálních kmenových buněk v extracelulárním matrix s využitím transwell testu pomocí konfokálního mikroskopu. MSC byly získány z lidské tukové tkáně (C-12977 Sigma-Aldrich s. r. o.) a pro imitaci ECM (extracelulární matrix) poslouží kolagen. Na Obr. 3.1 je zjednodušené schéma průběhu experimentu. Nejvýše je vyobrazena jedna z jamek transwell testu, kde v její vrchní komůrce je kolagenový gel s buňkami obarvenými CMFDA (fluorescenční barvivo CellTracker™ Green CMFDA) a ve spodní komůrce je směs kultivačního média a chemoatraktantu. Po 24 hodinách inkubace buňky migrovaly na základě chemotaktického gradientu skrz gel a některé i skrz membránu, kde adherovaly na její spodní stranu. V posledním kroku je zobrazena jamka, u které již proběhla fixace buněk a seškrábnutí gelu z vrchní strany membrány a nyní jsou ponořeny do DAPI (fluorescenční barvivo DAPI) pro obarvení jader buněk. Všechny zmíněné kroky experimentu a další jsou v následujících podkapitolách detailně popsány.

3.1 Seznam potřebného vybavení a přístrojů

- Chladicí zařízení
- Inkubátor
- Laminární box
- Vodní lázeň
- Laboratorní centrifuga
- Světelný mikroskop
- Fluorescenční mikroskop
- Konfokální mikroskop
- Vortex
- Drtič ledu
- Bürkerova komůrka
- Transwell test
- 24 jamkové kultivační destičky
- Nastavitelné pipety
- Sterilní špičky pro pipety
- Mikrozkuřavky typu Eppendorf (eppendorfký)
- Petriho misky

- Pinzeta
- Vátové tyčinky
- Alobal

[32], [33]



Obr. 3.1: Schéma průběhu experimentu.

3.2 Seznam potřebných chemikálií

- Kultivační médium (mesenchymal stem cell growth medium 2)
- PBS (fosfátový pufr - phosphate buffered saline)
- Akutáza
- Kultivační médium bez fetálního bovinního séra (mesenchymal stem cell basal medium)

- 10x DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)
- Destilovaná voda
- Fluorescenční barvivo CellTracker™ Green CMFDA
- Barvivo Luna cell counter standard calibration beads
- PDGF-BB (0,1 mg/ml)
- Kolagen I. typu (5 mg/ml)
- NaOH (1M)
- NaHCO₃ (7,5%)
- Paraformaldehyd (4%)
- Triton X (0,1%)
- Fluorescenční barvivo DAPI
- Ethanol pro dezinfekci pomůcek a prostoru

[32], [33]

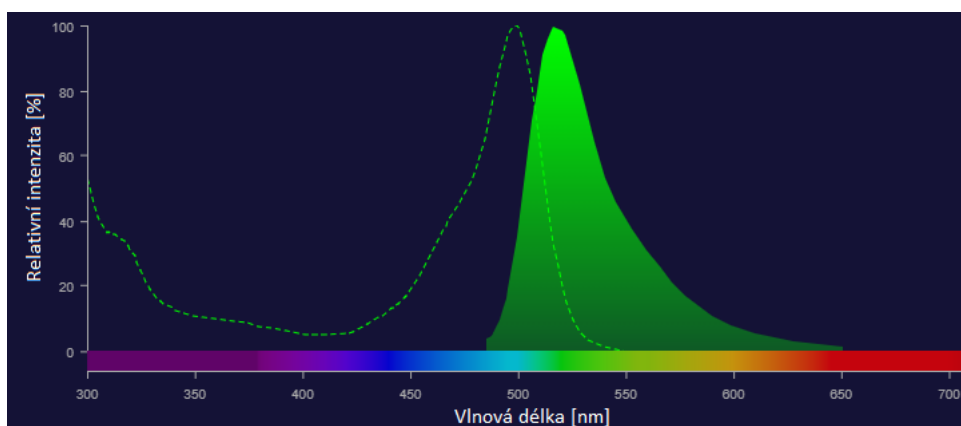
3.3 Kultivace MSC

Kultivace buněk probíhá za přísných podmínek nastavených parametrů inkubátoru. Teplota udržovaná uvnitř inkubátoru byla nastavena na hodnotu 37 °C, koncentrace oxidu uhličitého na hodnotu 5 % a vlhkost vzduchu na hodnotu 72 %. Buňky byly umístěné v jamkách kultivačních destiček naplněných kultivačním médiem, které obsahuje mnoho látek zajišťujících ideální prostředí pro život a množení buněk (např.: sérum, proteiny, peptidy, vitamíny, antibiotika, aminokyseliny a další). Potřebné složky v médiu jsou ovšem po určité době buňkami vyčerpány, a proto je třeba médium pravidelně měnit. Dalším omezením pro neustálé rozrůstání buněčné linie je prostor. Procentuální pokrytí povrchu jamky kultivační destičky buňkami je nazýváno konfluencí a ta je ověřována pomocí světelného mikroskopu. V případě, že konfluencí přesáhne hodnotu 70 %, tak se s touto jamkou může přistoupit k prvnímu kroku experimentu. [32], [33]

3.4 Barvení MSC fluorescenčním barvivem CMFDA

Prvním krokem tohoto experimentu je barvení buněk fluorescenčním barvivem pro detekci buněk pomocí fluorescenčního konfokálního mikroskopu. Jedná se o barvivo CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetát), které jednoduše projde buněčnou membránou a následně se změní v nepropustný fluorescenční produkt. Je tak zajištěno, že se barvivo dále nedostává do sousedních buněk a je velmi vhodné pro pohybující se buňky. Díky tomu, že je buňkami dobře zadržováno, je vhodné i pro déle probíhající experimenty (max. 72 hodin), kdy může probíhat

buněčná proliferace a barvivo je tak předáváno dalším generacím buněk. Dále se vyznačuje nízkou cytotoxicitou (zajištění životaschopnosti a proliferace buněk), stabilitou a jasnou fluorescencí při fyziologických hodnotách pH. Výhodou je velmi jednoduché použití a možnost společného sledování s buňkami obarvenými červeným fluorescenčním barvivem. Tato vlastnost je dána jeho excitačním a emisním spektrem (znázorněna na Obr. 3.2), kdy maxima vlnových délek jsou 492 nm pro excitační záření a 517 nm pro emisní záření. [21]



Obr. 3.2: Fluorescenční spektra barviva CellTracker™ Green CMFDA, přerušovanou čarou znázorněno excitační a plně emisní spektrum. Upraveno dle [21]

Protokol barvení MSC fluorescenčním barvivem CMFDA [33]

- Do eppendorfky přidat 500 μ l kultivačního média bez fetálního bovinního séra a 0,5 μ l CMFDA.
- Pomocí vortexu směs promíchat.
- Z jamky odsát staré médium.
- Buňky promýt 200 μ l PBS.
- Do jamky přidat směs a vložit do inkubátoru na 15 minut.
- Po inkubaci zkontrolovat fluorescenci buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu.

3.5 Pasážování MSC

Obecnou pasáží buněk je docíleno udržení buněčné linie a je získána část buněk pro provedení experimentu. V tomto případě jsou buňky v jamce již obarveny fluorescenčním barvivem, a proto již nebudou nasazeny do nové jamky a kultivovány.

Protokol pasážování MSC [32], [33]

1. Odstranit směs média a barviva z jamky.
2. Buňky promýt 200 μ l PBS.
3. Přidat 200 μ l akutázy, kapalinu lehkým pohybem rozprostřít po celém povrchu a vložit na 3 minuty do inkubátoru.
4. Po vytažení z inkubátoru zkontrolovat pod mikroskopem, že se buňky pohybují volně v roztoku.
5. Přidat 600 μ l kultivačního média a pipetováním 5x až 7x jemně buňky resuspendovat.
6. Suspenzi buněk přemístit do eppendorfký.
7. Centrifugovat 4 minuty na 800 otáček za minutu.
8. Opatrně odsát supernatant a v eppendorfce ponechat pouze pelet.
9. Přidat 500 μ l kultivačního média a pipetováním buňky opět resuspendovat. Tímto je připravená buněčná suspenze.

3.6 Výpočet koncentrace buněk v suspenzi pomocí Bürkerovy komůrky

Bürkerova komůrka se skládá z upraveného podložního sklíčka a krycího sklíčka. V podložním sklíčku je vytvořen odtokový žlábek ve tvaru písmene H, který tvoří dvě počítací plošky. V těchto ploškách je vytvořena mikromřížka o přesně definovaných rozměrech.

Na Obr. 3.3 je zobrazeno schéma mřížky komůrky. Červeně je naznačen čtverec s plochou 0,04 mm², který je často používán pro počítání buněk. Může být ovšem použit i modře vybarvený čtverec, který má plochu 0,0025 mm². Jak je zobrazeno v pravé části schématu, do celkového počtu buněk v určitém čtverci se započítávají ty buňky, které se celou svojí plochou nachází uvnitř čtverce a také ty, které se dotýkají dvou zvolených hran čtverce (nejčastěji se jedná o horní a pravou hranu). Zabrání se tak započítání jedné buňky dvakrát. Postup výběru čtverců, ve kterých jsou buňky počítány, je naznačen v levé části schématu pomocí šipek.

Vzorec pro výpočet počtu buněk v 1 mm³:

$$b = \frac{n \cdot z}{c \cdot v \cdot h}, \quad (3.1)$$

kde b značí počet buněk v 1 mm³, n je celkový počet napočítaných buněk, c je počet čtverců, ve kterých se buňky počítaly, v značí plochu použitého čtverce (0,04 nebo 0,0025 mm²), h je hloubka komůrky (0,1 mm) a z je použité zředění suspenze. [20]

Protokol použití Bürkerovy komůrky [33]

1. V eppendorfcce smíchat 20 μ l buněčné suspenze s 20 μ l barviva Luna cell counter standard calibration beads.
2. Na obě počítací plošky čisté a osušené Bürkerovy komůrky přidat po 20 μ l směsi.
3. Opatrně přiklopit krycím sklíčkem a připevnit držáčky.
4. Komůrku vložit pod mikroskop a s vhodným zvětšením počítat buňky v alespoň 16 čtvercích.

Příklad výpočtu koncentrace buněk v suspenzi

V 16 čtvercích o ploše 0,04 mm² bylo napočítáno 23 buněk a ředění bylo 2. Použita byla rovnice (3.1).

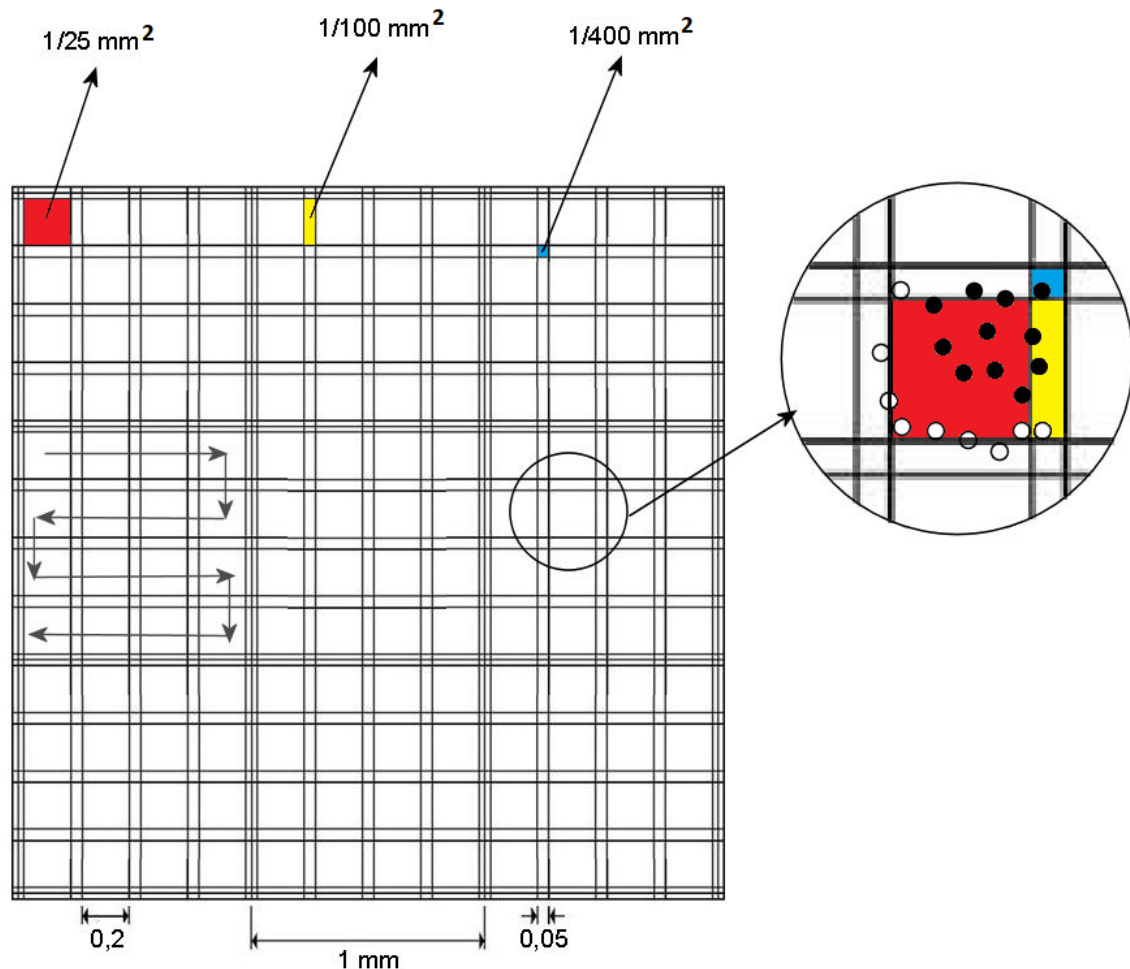
$$b = \frac{n \cdot z}{c \cdot v \cdot h} = \frac{23 \cdot 2}{16 \cdot 0,04 \cdot 0,1} = 718,75 \text{ buněk/mm}^3$$

Výsledná koncentrace buněčné suspenze byla 718,75 buněk/mm³.

3.7 Příprava kolagenového gelu

Gel, který bude sloužit jako náhrada za extracelulární matrix pro MSC je připraven z kolagenu. Kolagen je vláknitý protein, který se skládá ze tří α -řetězců. Řetězce, typicky repetitivně složené z aminokyselin glycinu, hydroxyprolinu a prolinu, společně vytvářejí trojitou spirálu, čímž zajišťují ECM pevnost v tahu a stabilitu. Následně se spirály shlukují do fibril, a ty pak polymerizují na vlákna, ze kterých se skládají tkáně jako jsou šlachy nebo dermis. Pro extrakci kolagenu z tkáně se používají kyseliny nebo enzymy. V prostředí s nízkým pH při použití kyselin vlákna disociují na fibrily a výhodou je maximální zachování nativního stavu kolagenu. V kyselém prostředí jsou fibrily rozloženy neorientovaně a vytváří se mezi nimi vodíkové můstky, které způsobí, že roztok je poměrně vysoce viskózní. Pokud je poté změněno prostředí z kyselého na neutrální, začnou fibrily opět polymerizovat na vlákna a vznikne 3D gel, kde síťování vláken kolagenu je vysoké a s tím je vysoká i jeho viskozita. [15]

K vytvoření gelu pro sledování chemotaxe ve 3D v experimentu této práce byl použit kolagen I. typu, který je extrahován pomocí kyseliny z ocasní šlachy krys. Jedná se o vysoce kvalitní, čistý a sterilní protein vhodný pro přípravu gelu, který se svými vlastnostmi velice blíží *in vivo* ECM. Jeho využití je velice široké: kultivace buněk ve 3D a jejich snímání, vytvoření scaffoldu pro organoidy a sféroidy, použití kolagenového gelu v μ -Slide Chemotaxis, studium diferenciac buněk ve 2D versus ve 3D, potažení nádob pro buněčné kultury tenkou vrstvou kolagenu pro lepší adhezi



Obr. 3.3: Schéma mřížky Bürkerovy komůrky. [19]

buněk. Díky své nízké autofluorescenci je kolagen vhodný také pro tento experiment, jelikož bude využita fluorescenční konfokální mikroskopie. [15]

Před začátkem přípravy gelu je třeba určit několik parametrů. Výsledná koncentrace kolagenu v gelu byla zvolena na 1 mg/ml [32], výsledné množství gelu na 300 μ l a bylo zvoleno, že buňky budou přidány přímo do kolagenového gelu v počtu 1×10^4 . [36] Pro zjištění objemu buněčné suspenze, který bude přidán do gelu pro dodržení stanoveného počtu buněk, je třeba učinit výpočet dle následující rovnice:

$$X = \frac{a}{b \cdot 1000}, \quad (3.2)$$

kde X značí objem buněčné suspenze v ml, a značí stanovený počet buněk a b značí počet buněk v 1 mm³. Pro příklad výpočtu X zvolíme a rovno 1×10^4 a b rovno 718,75 buněk/mm³ (jak vyšlo v příkladě výpočtu koncentrace buněčné suspenze

pomocí Bürkerovy komůrky na straně 35). Dosazení do rovnice (3.2):

$$X = \frac{a}{b \cdot 1000} = \frac{10000}{718,75 \cdot 1000} = 0,014 \text{ ml}$$

V následujícím postupu přípravy gelu je přidáváno 50 μl směsi buněčné suspenze a kultivačního média. Jejich poměr je stanoven právě předchozím výpočtem. V tomto případě by tedy bylo smícháno 14 μl buněčné suspenze a 36 μl kultivačního média. Pro předejití nechtěného brzkého gelování kolagenu je třeba uchovávat směs co nejvíce v ledu.

Protokol přípravy kolagenového gelu [15]

1. Vložit kolagen, NaOH, NaHCO_3 a prázdnou eppendorfku do ledu.
2. Do eppendorfky postupně přidat 20 μl 10x DMEM, 5 μl NaOH, 112 μl destilované vody, 3 μl NaHCO_3 a 50 μl kultivačního média. Směs řádně promíchat.
3. Eppendorfku s 60 μl kolagenu krátce v ruce zahřát a přidat do ní směs namíchanou v předchozím kroku. Směs opět řádně promíchat a vyvarovat se vzniku bublin.
4. Přidat 50 μl předem namíchané směsi buněčné suspenze a kultivačního média. Výslednou suspenzi řádně resuspendovat a vložit do ledu.

3.8 Příprava Transwell testu

Pro tento experiment je využit model transwell testu Corning® Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts, který se skládá z celkově 24 od sebe oddělených jamek. Jamky obsahují 10 μm silnou průsvitnou polykarbonátovou membránu s póry o velikosti 8 μm a jsou ošetřeny pro optimální přilnavost buněk k povrchu. Sterilita testu je zajištěna gama zářením. Tento test je jednoduchý na použití a vhodný pro adherující i neadherující buňky. [33], [35]

Pro jeden experiment byly použity tři transwell jamky. První slouží jako negativní kontrola, a ve spodní komůrce se proto nachází pouze kultivační médium bez přidaného chemoatraktantu. Zbylé dvě jamky obsahují kromě média i PDGF-BB ve výsledných koncentracích 40 ng/ml a 60 ng/ml, který slouží jako chemoatraktant pro MSC. [33], [37]

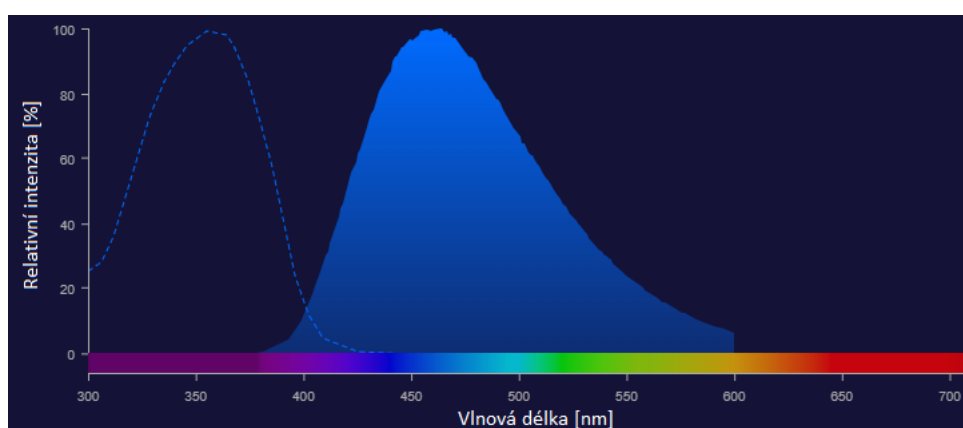
Protokol přípravy transwell testu [33]

1. Pinzetou přemístit tři transwell komůrky do jamek nové kultivační destičky.
2. Do vrchních komůrek transwell testu vložit 80 μl připraveného kolagenového gelu. Případné bubliny odsát pipetou.

3. Kultivační destičku s naplněnými transwell komůrkami vložit do inkubátoru na 30 minut.
4. Spodní komůrky naplnit odpovídajícími roztoky: (I) 500 μ l kultivačního média, (II) 500 μ l kultivačního média a 0,2 μ l PDGF-BB, (III) 500 μ l kultivačního média a 0,3 μ l PDGF-BB. Komůrky je třeba popsat.
5. Do vrchních komůrek přidat 200 μ l kultivačního média.
6. Takto připravené transwell testy vložit do inkubátoru na 24 hodin.

3.9 Barvení jader MSC fluorescenčním barvivem DAPI

Po uplynutí 24 hodin jsou transwell testy skenovány pomocí fluorescenčního konfokálního mikroskopu. Konfokální mikroskopie a použitý mikroskop Leica TCS SP8 X je podrobně popsán v podkapitole 1.4 na stránce 22. Protože MSC jsou adhezující buňky, tak ty, které migrují skrze gel a membránu zůstávají na její druhé straně. Rychlost migrace ovšem záleží na chemickém gradientu, který se ve třech jamkách liší. Některé buňky proto budou po 24 hodinách v gelu, některé na vrchní a některé na spodní straně membrány transwell testu. V konfokálním mikroskopu je zaměřena pouze jedna rovina, a to rovina membrány. Přesto není možné zaměřit přesně pouze spodní stranu membrány bez toho, aby snímek neovlivňovaly i buňky mimo ni. Proto je dalším krokem experimentu fixace buněk na spodní straně membrány pomocí paraformaldehydu a odstranění buněk, které skrz ni nemigrovaly. Membrány buněk jsou narušeny působením Tritonu X a jádra fixovaných buněk na membráně jsou obarvena fluorescenčním barvivem DAPI. Toto barvivo barví modře jádra buněk, čímž se počítání buněk stane jednodušším. Jeho spektra jsou znázorněna na Obr. 3.4.

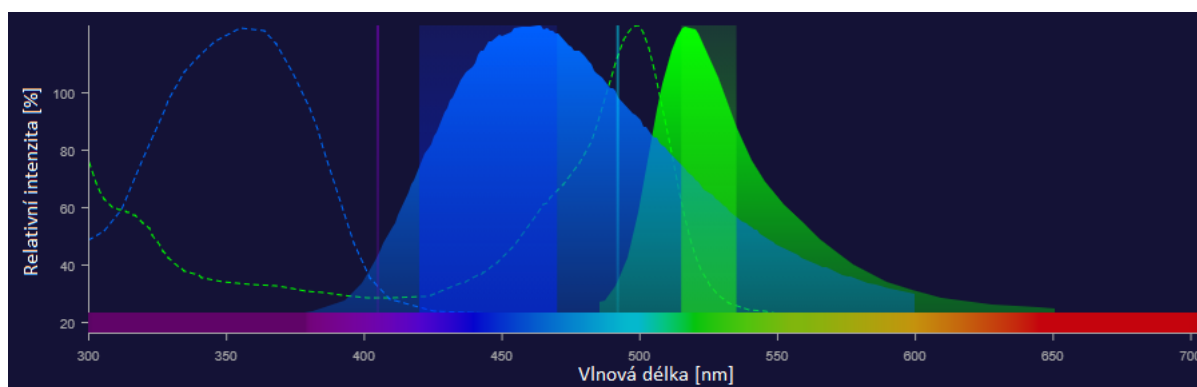


Obr. 3.4: Fluorescenční spektra barviva DAPI, přerušovanou čarou znázorněno excitační a plně emisní spektrum. Upraveno dle [34]

Protokol barvení jader MSC fluorescenčním barvivem DAPI [33]

1. Připravit 5 Petriho misek: 2x PBS (3 ml), paraformaldehyd (1 ml), Triton X (1 ml), DAPI (smíchat 10 μ l DAPI s 1000 μ l PBS, přikrýt alobalem).
2. Z vrchních i spodních komůrek jamek transwell testů odsát veškeré roztoky.
3. Komůrky propláchnout v první misce PBS.
4. Komůrky postavit do misky s paraformaldehydem na 30 minut.
5. Komůrky propláchnout v první misce PBS.
6. Pomocí vatových tyčinek seškrábnout gel z vrchní strany membrány.
7. Komůrky postavit do misky s paraformaldehydem na 10 minut.
8. Komůrky propláchnout v první misce PBS.
9. Komůrky postavit do misky s Tritonem X maximálně na 5 minut.
10. Komůrky rychle propláchnout v první misce PBS.
11. Komůrky postavit do misky s DAPI na 30 minut a přikrýt alobalem.
12. Komůrky propláchnout ve druhé misce PBS.
13. Tři nové jamky kultivační destičky naplnit 500 μ l PBS, vložit do nich komůrky a do vrchních komůrek přidat 300 μ l PBS. Kultivační destičku zabalit do alobalu.

Posledním krokem je skenování membrány fluorescenčním mikroskopem a to v sekvenci nejdříve s nastavením pro snímání buněk obarvených zeleným fluorescenčním barvivem CMFDA a následně s nastavením pro snímání jader buněk obarvených modrým fluorescenčním barvivem DAPI. Pro excitaci barviva CMFDA je použita vlnová délka 492 nm a pro snímání odezvy je nastaveno pásmo vlnových délek 505 až 545 nm. Pro excitaci barviva DAPI je použita vlnová délka 405 nm a pro snímání odezvy je nastaveno pásmo vlnových délek 415 až 475 nm. Fluorescenční spektra a pro snímání použité vlnové délky světla jsou vyznačeny na Obr. 3.5. Je zřejmé, že vlnová délka excitačního světla pro barvivo DAPI by ideálně měla být nižší (přibližně 360 nm), na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8 X je ovšem vlnová délka 405 nm minimum, kterého je schopen mikroskop dosáhnout. Výstupem jednoho experimentu jsou tedy tři sady snímků pro tři jamky. Jedná se o snímek buněk před seškrábnutím gelu z vrchní strany membrány, kdy jsou buňky značeny zeleným barvivem CMFDA. Dále o stejný snímek, ale po seškrábnutí gelu a konečně o snímek jader barvených modrým barvivem DAPI.



Obr. 3.5: Fluorescenční spektra barviv CMFDA (zeleně) a DAPI (modře), přerušovanou čarou znázorněno excitační a plně emisní spektrum, tenkou čarou (fialovou, modrou) znázorněn nastavený excitační filtr a širokým pásmem (modrým, zeleným) znázorněn nastavený emisní filtr pro snímání. Upraveno dle [34]

4 Zpracování dat

Všechny experimenty byly skenovány dvakrát, jak již bylo zmíněno v minulé kapitole. Výstupem každého snímání byl mikroskopický snímek z bright field kanálu, který je vidět na Obr. 4.1a. Dále byla membrána snímána v nastavení pro zelené fluorescenční barvivo CMFDA a pro modré fluorescenční barvivo DAPI. Příklady jsou vidět na Obr. 4.1e a 4.1c (jedná se o pseudobarvené šedotónové snímky). Pro jednodušší zpracování jsou ovšem použity původní šedotónové snímky, které jsou zobrazeny na Obr. 4.1f a 4.1d. Pouhým okem je možné srovnat snímek z bright field kanálu konfokálního mikroskopu a výstupy ze snímání fluorescenčním mikroskopem a je vidět, že detekovat buňky ve snímku z bright field kanálu by bylo složité či spíše až nemožné. MSC jsou totiž bez obarvení téměř průhledné a splývají se složitou strukturou kolagenního gelu. Proto má tento snímek pouze doplňující funkci. Následně, pokud jsou srovnány fluorescenční snímky, tak je zjištěno, že se liší pouze minimálně. Je to způsobeno tím, že místo toho, aby barvivo DAPI obarvilo pouze jádra buněk, obarvilo buňky celé stejně jako barvivo CMFDA. Tuto chybu se nepodařilo odstranit ani u dalších experimentů, u kterých byl mírně pozměněn protokol barvení jader barvivem DAPI. Změna se týkala doby jakou byly buňky v roztoku Tritonu X. Byla lehce zkrácena, ale i přes to byly membrány buněk nejspíše příliš narušeny a barvivo se tak dostalo do celé buňky. Tento problém dále ovlivnil jeden z cílů zpracování dat. Z Obr. 4.2 nebo z Obr. 4.3 je zřejmé, že celá plocha membrány není snímána najednou kvůli její velikosti a potřebnému rozlišení. Výsledný snímek je tak seskládán z 32 navazujících a nepřekrývajících se čtverců o velikosti 1024x1024 pixelů.

Cíle zpracování dat byly stanoveny ještě před samotným začátkem experimentu a protokoly postupů jim byly proto přizpůsobeny.

1. Zjistit konfluenci před seškrábnutím gelu.
2. Zjistit konfluenci po seškrábnutí gelu.
3. Zjistit počet buněk, které migrovaly skrz membránu.

Data byla zpracovávána v programovém prostředí Matlab R2021a. Pro první dva stanovené cíle byly vytvořeny skripty, které data načtou, zpracují a výstupem je hodnota konfluencí buněk. Podrobněji jsou kroky zpracování dat pro dosažení jednotlivých cílů blíže popsány v následujících podkapitolách.

4.1 Konfluencí před seškrábnutím

Příklad jak vypadá nasnímaná membrána před seškrábnutím gelu je na Obr. 4.2a. Při srovnání konfluencí pouze odhadem před seškrábnutím gelu a po (Obr. 4.2), je

viditelný zásadní rozdíl. Před seškrábnutím gelu je až několikanásobně vyšší. Snímání před seškrábnutím gelu je ovlivňováno několika vlivy, které se projevují velmi výrazně. Nejprve je problémem sama membrána, která je téměř průsvitná, takže přes ni můžou některé buňky prosvítat a jeví se pak jako by migrovaly skrz ni a byly na její spodní straně. Tento jev je také částečně způsobem malým zvětšením (objektiv se zvětšením 10x), při větším zvětšení se tento jev neprojevuje. Dále membrána nedrží úplně vodorovný tvar, může se částečně zvlnit, takže při zaměření jedné roviny v mikroskopu je možné, že ve výsledném snímku jsou některé buňky ze spodní a některé z vrchní strany membrány. Důležitým faktorem je také celkový počet buněk v gelu. I přes počítání koncentrace buněk pomocí Bürkerovy komůrky a pipetování přesného objemu suspenze do gelu nebude nikdy počet buněk v každé jamce stejný. Tím, že je suspenze buněk smíchána s gelem a následně vložena do vrchní komůrky je způsobeno, že některé buňky jsou už na začátku experimentu blízko membrány a naopak některé od membrány dělí celá vrstva gelu. I když tedy na buňky působí chemoatraktant a migrují skrz gel, nemusí jim stačit 24 hodin inkubace na to, aby dosáhly membrány a migrovaly skrz ni. Ono rozložení buněk v gelu se v jamkách liší a stává se tak dalším ovlivňujícím faktorem. MSC jsou buňky adherující, což znamená, že v průběhu inkubace migrují nejen na základě chemotaktického gradientu, ale také na základě gravitace směrem dolů k membráně. Dalším faktorem je hustota kolagenního gelu. Se zvyšující se hustotou je migrace pro buňky složitější a trvá tedy déle. Ne všechny buňky také můžou experiment přežít. Takové buňky při snímání neprodukují fluorescenční záření a nejsou tak zahrnuty do výpočtu konfluence. Počet mrtvých buněk se může také od jamky k jamce lišit a ovlivňovat tak výsledky.

Prvním krokem skriptu vytvořeného pro zjištění konfluency buněk před seškrábnutím gelu je načtení 32 šedotónových 8 bitových snímků tvořící dohromady celý snímek membrány. Jednotlivé snímky jsou umocněny empiricky stanovenou hodnotou pro zvýšení kontrastu v obraze. Tato hodnota je v rozsahu od 1 do 10. U některých snímků se totiž stalo to, že fluoreskovaly nejen buňky, ale částečně i pozadí. Tohoto jevu je možné si všimnout na Obr. 4.3, kde jsou od sebe viditelně oddělitelné jednotlivé čtverce, protože nejenže pozadí fluoreskuje, ale fluorescence je nepravidelná a dochází k jakémusi stínování. Takovéto snímky proto nebyly umocňovány vůbec nebo pouze s nízkou hodnotou. Umocňováním se totiž šum pozadí pouze zesiloval a detekce buněk se stávala složitější. Naopak na příklad na Obr. 4.1f jsou jasně viditelné pouze buňky a téměř žádné pozadí. Tento typ snímků pak mohl být umocňován vysokou hodnotou, zvýrazněny byly pouze buňky a jejich detekce se stala jednodušší. Umocněním se samozřejmě zvýší i hodnota jakéhokoliv šumu v obraze, ten se převážně projevoval jako impulzní šum, a proto byl na snímky aplikován 2D mediánový filtr.

Pro segmentaci obrazu a následnou detekci buněk byla použita metoda základního prahování s empiricky stanoveným globálním prahem. Prahováním byl snímek rozdělen na pozadí s přiřazenou hodnotou nula a detekované buňky s přiřazenou hodnotou jedna, výsledkem byl tedy binární obraz. Kromě šumu, který byl v určité míře opět přítomný, výsledek konfluence znehodnocovaly i fluoreskující póry v membráně. Samy o sobě póry nefluoreskují, ale MSC jsou mnohonásobně větší než 8 μm póry a ve chvíli, kdy adherují na vrchní stranu membrány a chemoatraktantem jsou nuceny migrovat, začnou hledat cestu skrze ni. Jedna buňka se tak může pokoušet migrovat několika póry zároveň. Pokud v tuto chvíli dojde ke snímání membrány, tak celá buňka ještě nemigrovala skrz a jsou pouze zobrazeny její výběžky v pórech. Tato buňka by proto neměla být započítávána do výsledné konfluence migrovaných buněk. Se znalostí velikosti snímku v pixelech a rozlišení v jednotkách DPI byla do počítána plocha jednoho póru v pixelech. Tato hodnota je zaokrouhleně 38,9 px. Byla proto použita funkce pro odstranění objektů menších než práh, jehož hodnota byla stanovena na 40 px na základě vypočtené hodnoty velikosti pórů. Výjimečně byla pro některé snímky použita i funkce pro odstranění objektů větších než stanovený práh. Jednalo se o fluorescenčním barvivem zvýrazněné nečistoty, které následně velmi znehodnocovaly výsledky konfluence. Práh byl stanoven v řádech tisíců pixelů (2000 až 4000 px). Posledním krokem ve zpracování obrazů je morfologická operace dilatace obrazu se strukturním elementem tvaru čtverce o šířce 2 px. Touto operací je zajištěno vyplnění oblastí buněk a zarovnání jejich okrajů, ve výsledku pak tvary buněk více odpovídají realitě. Výsledný obraz s červeně vyznačenými detekovanými buňkami je zobrazen na Obr. 4.1b. Při srovnání s šedotónovým snímkem buněk obarvených barvivem CMFDA (4.1f) je vidět, že zpracováním obrazu se do cílilo zvýraznění celé plochy buněk a některých jejich částí, které jsou v původním obraze okem nepozorovatelné.

Výsledná konfluence je vypočtena jako podíl součtu ploch všech detekovaných buněk na membráně a plochy celé membrány. Vynásobením podílu 100 krát je výsledná konfluence určena v procentech. Plocha membrány v pixelech byla vypočítána pomocí změřeného průměru membrány v pixelech. Jednotlivé výsledky experimentů jsou zapsány v následující páté kapitole.

4.2 Konfluence po seškrábnutím

Seškrábnutí gelu z vrchní strany membrány probíhá pomocí vatových tyčinek. Kvůli tvaru vatové tyčinky není možné setřít gel po okrajích komůrky, a proto ho tam část zůstává. Velmi zřetelně se to projeví při srovnání počtu buněk ve středu membrány a na okraji. Rozdíl je viditelný na Obr. 4.2b, kde na okrajích je vidět o mnoho více buněk než na okrajích. Aby tento jev nezpůsobil nepřesnosti ve výsledcích, jsou

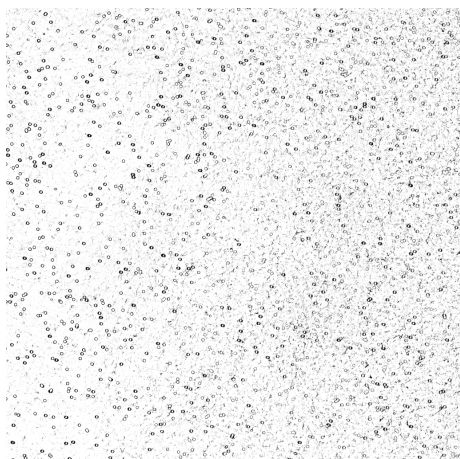
buňky detekovány pouze ve čtvercích, na kterých není zachycen okraj membrány. Jedná se tak o 12 středových čtverců, které jsou červeně vyznačené na Obr. 4.3.

Pro výpočet konfluence po seškrábnutí gelu byl vytvořen nový skript, který ovšem vychází ze skriptu popsaného v předchozí podkapitole 4.1 a bylo provedeno pouze pár změn. První změnou je, že jako výchozí snímek není použit pouze snímek buněk obarvených barvivem CMFDA, ale i snímek buněk obarvených barvivem DAPI. Jak je vidět na Obr. 4.1, tak oba snímky se sice liší pouze mírně, ale každé barvivo více zvýrazňuje jiné části buněk nebo jiné buňky. Tím, že jsou na začátku oba snímky sečteny, tak je zaručena lepší a přesnější detekce buněk. Takto sečtené snímky jsou opět umocňovány empiricky stanovenou hodnotou pro zvýšení kontrastu a filtrovány 2D mediánovým filtrem pro odstranění šumu. Následuje základní prahování s empiricky stanoveným prahem, odstranění objektů menších než 40 px, dilatace obrazu se strukturním elementem tvaru čtverce o šířce 2 px a případné odstranění detekovaných nečistot.

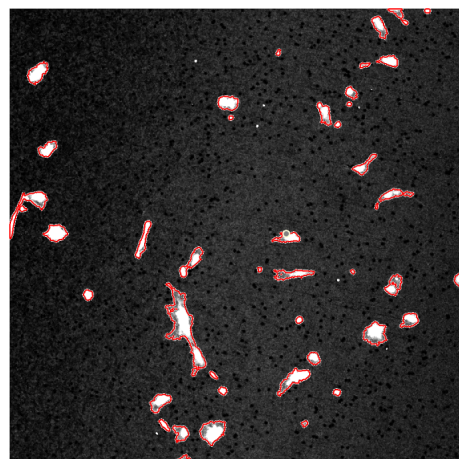
Druhou změnou je, že konfluence je počítána jako podíl součtu ploch všech detekovaných buněk na membráně a plochy 12 čtverců. Výsledek je opět vynásoben 100 krát pro získání konfluence v procentech. Jednotlivé výsledky experimentů jsou také zapsány v páté kapitole.

4.3 Počet buněk migrovaných skrz membránu

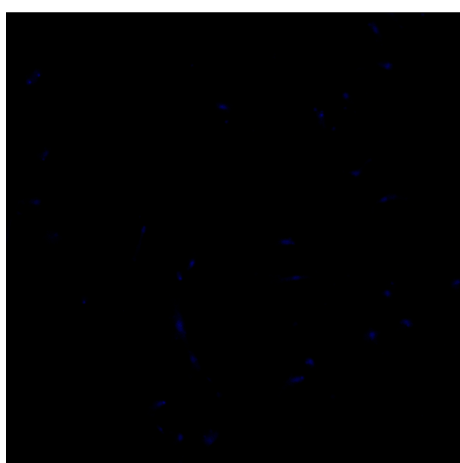
Jak již bylo dříve zmíněno, ve chvíli snímání membrány jsou některé buňky zachyceny v procesu migrace skrz membránu. Nasnímána může být tedy jen její část a tím pádem není přesné tuto část započítat jako plně migrovanou buňku na spodní stranu membrány. Buňka také na začátku migrace skrz zkouší projít více póry zároveň. Výsledkem je několik fluorescenčně zvýrazněných pórů. Kdyby byl tedy počet buněk počítán jako počet objektů v obraze, neodpovídalo by to reálnému počtu plně migrovaných buněk na spodní stranu membrány. Proto byly po inkubaci buňky na membráně fixovány a barveny pomocí fluorescenčního barviva DAPI, které má obarvit pouze jádra buněk. Pokud je tedy na membráně po seškrábnutí gelu viditelné jádro buňky, je předpokládáno, že skrz migrovala už celá buňka. Tohoto třetího cíle ovšem nebylo dosaženo z důvodu nepodařeného barvení jader buněk. Barvivo DAPI obarvilo celou buňku, nejen jádro, a tak se výsledný snímek velmi výrazně podobal snímku s použitím fluorescenčního barviva CMFDA. Oba snímky tím tak mají v podstatě stejnou vypovídající hodnotu a nelze ani jeden použít pro zjištění počtu migrovaných buněk.



(a)



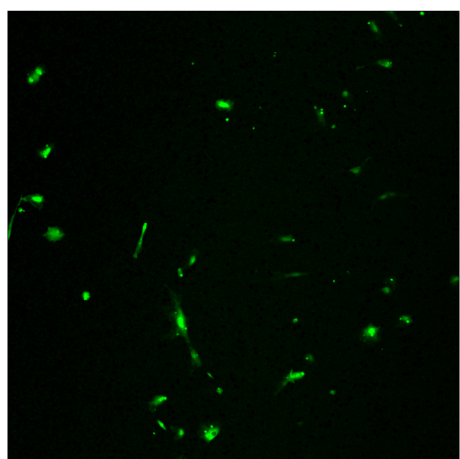
(b)



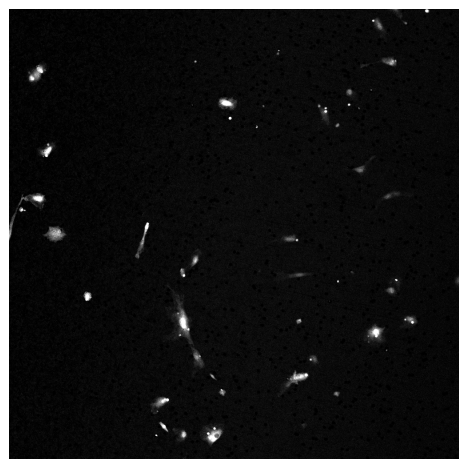
(c)



(d)

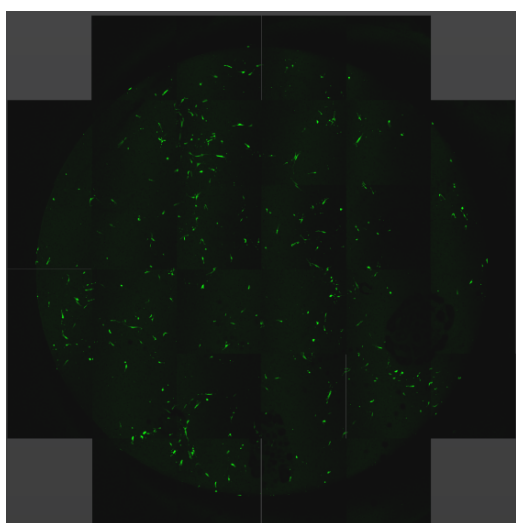


(e)

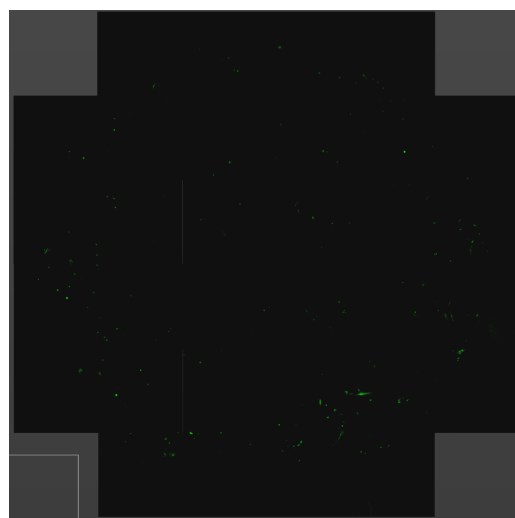


(f)

Obr. 4.1: (a) Snímek z bright field kanálu konfokálního mikroskopu, (b) Snímek zpracovaného šedotónového snímku s červeně vyznačenými detekovanými buňkami, (c) Pseudobarvený snímek z fluorescenčního konfokálního mikroskopu s nastavením pro snímání modrého barviva DAPI, (d) Snímek (c) v šedotónové podobě, (e) Pseudobarvený snímek z fluorescenčního konfokálního mikroskopu s nastavením pro snímání zeleného barviva CMFDA, (f) Snímek (e) v šedotónové podobě.

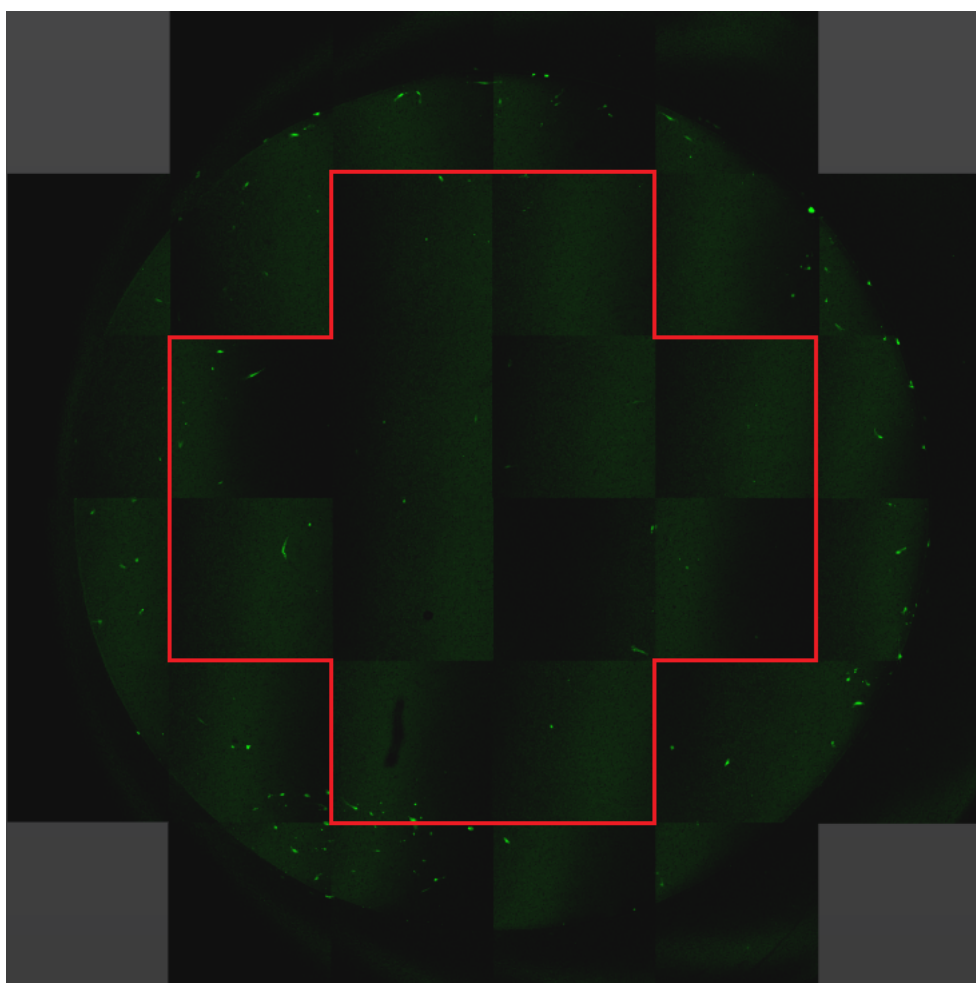


(a) Před seškrábnutím gelu



(b) Po seškrábnutí gelu

Obr. 4.2: Rozdíl mezi membránou před a po seškrábnutí gelu (jamka (I) - negativní kontrola).



Obr. 4.3: Snímek membrány po seškrábnutí gelu s červeně vyznačenou oblastí 12 čtverců.

5 Výsledky experimentů

Celkově bylo provedeno sedm experimentů a u každého byla zjištěna hodnota konfluencí před a po seškrábnutí gelu. Výsledky jsou zapsány v Tabulkách 5.1 a 5.2, kde každý sloupec značí jeden experiment, každý řádek jednu ze tří jamek a hodnota konfluencí je udávána v procentech. Jamka (I) je negativní kontrola a ve spodní komůrce je přidáno pouze kultivační médium. Spodní komůrka jamky (II) obsahuje chemoatraktant PDGF-BB v koncentraci 40 ng/ml. Ve spodní komůrce jamky (III) se nachází PDGF-BB v nejvyšší koncentraci, a to 60 ng/ml. Snahou praktické části této diplomové práce bylo ověřit fakt, že MSC reagují pozitivně na chemotaktický gradient vytvořený chemoatraktantem PDGF-BB a jsou schopny migrovat skrz kolagenový gel, nahrazující ECM, a membránu transwell testu. Teorie tedy je, že čím vyšší je koncentrace chemoatraktantu ve spodní komůrce jamky, tím budou buňky migrovat rychleji a ve větším počtu.

Pokud je membrána snímána před seškrábnutím gelu, vyšší konfluencí by měla být u jamky (I), protože u jamek (II) a (III) buňky migrovaly rychleji a je jich už více na spodní straně membrány, tedy mimo zaměřenou rovinu snímání. V podkapitole 4.1 byly nastíněny různé vlivy, které ovlivňovaly množství buněk na snímcích před seškrábnutím gelu. Jedním z nich je i fakt, že MSC jsou buňky adhezní. Buňky v jamce (I) částečně vlivem chemotaktického gradientu a částečně vlivem gravitace klesly v gelu na membránu, ale už jí nemigrovaly, protože gradient nebyl tak silný. Při snímání membrány je tedy více buněk na její vrchní straně než na spodní a to se projeví vyšší hodnotou konfluencí. Pořadí od nejvyšší po nejnižší hodnotu konfluencí by mělo být jamka (I), jamka (II) a jamka (III).

Při snímání membrány po seškrábnutí gelu by mělo být pořadí jamek v hodnotách konfluencí opačné, tedy nejvyšší hodnotu by měla mít jamka (III), poté jamka (II) a naposledy jamka (I). Při nejvyšším chemotaktickém gradientu totiž nejvíce buněk kompletně migrovalo skrz membránu, byly zafixovány a následně nasnímány.

V následujících sedmi podkapitolách jednotlivých experimentů jsou vždy obě hodnoty konfluencí z Tabulek 5.1 a 5.2 graficky znázorněny pomocí grafů. Dále je zhodnoceno, zda výsledky odpovídají teoretickému předpokladu.

[%]	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7
(I)	0,3697	1,1574	1,3202	0,3745	1,0626	3,1967	0,7858
(II)	0,5301	1,0404	0,6517	0,8988	2,0208	4,0350	1,0076
(III)	0,6757	0,3203	0,4597	0,7621	1,8308	3,7135	1,3215

Tab. 5.1: Tabulka s výsledky konfluencí před seškrábnutím gelu

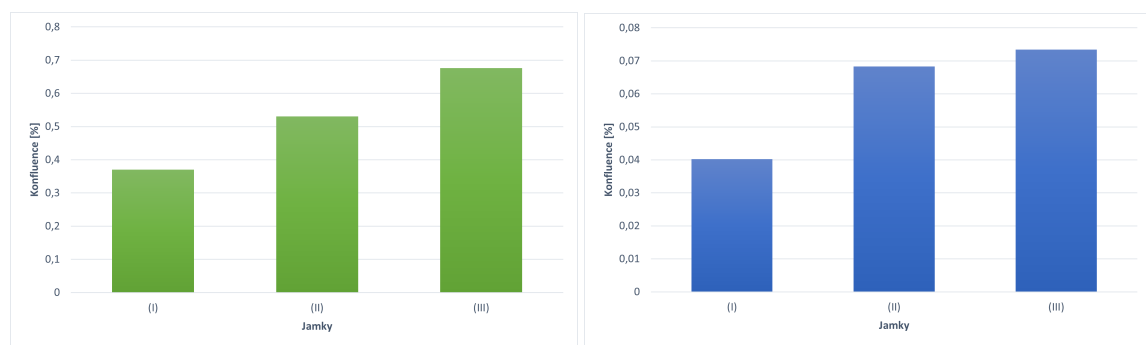
[%]	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7
(I)	0,0402	0,2590	0,1635	0,0948	0,1163	0,8856	0,3294
(II)	0,0683	0,3297	0,1789	0,4474	0,1109	1,7148	0,2749
(III)	0,0734	0,1006	0,1125	0,5735	0,0948	1,8195	0,6427

Tab. 5.2: Tabulka s výsledky konfluence po seškrábnutí gelu

5.1 Experiment 1

Jak již bylo nastíněno dříve, výsledky konfluence před seškrábnutím ovlivňuje mnoho faktorů, které se napříč experimenty můžou měnit. Jedním z nich je zaměření roviny snímání, které nemusí být vždy stejné. V případě tohoto experimentu jsou výsledky konfluence před seškrábnutím gelu přesně opačné než bylo teoreticky předpokládáno. Jak je vidět z grafu 5.1a, nejvyšší konfluence je u jamky (III) a nejnižší u jamky (I). Zdá se, že zaměřená rovina snímání byla spíše na spodní straně membrány, kde u jamky (III) migrovalo nejvíce buněk skrz.

Co se týče výsledků konfluence po seškrábnutí gelu, ty přesně odpovídají předpokladu. Graf 5.1b je v tomto případě velmi podobný grafu 5.1a. Rozdíl je v dosažených hodnotách konfluencí, které jsou u hodnot po seškrábnutí gelu očekávaně nižší.



(a) Před seškrábnutím gelu

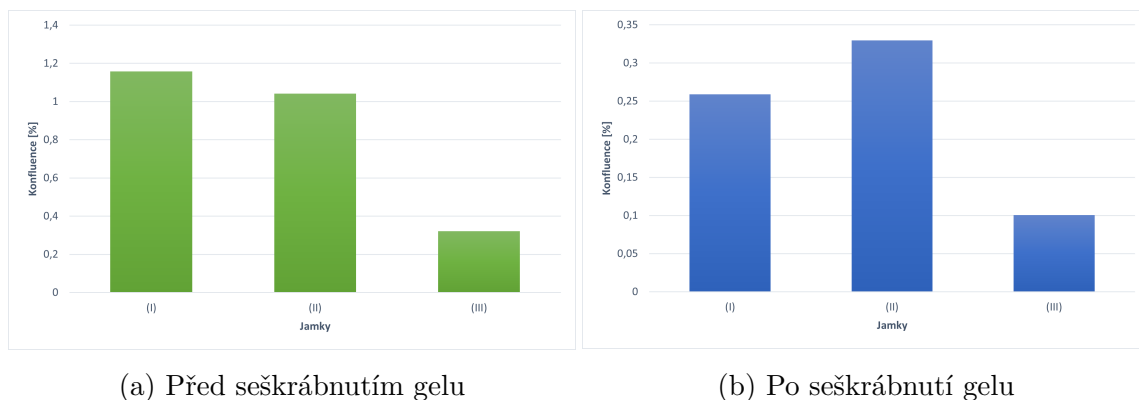
(b) Po seškrábnutí gelu

Obr. 5.1: Grafy vyhodnocení experimentu 1 před a po seškrábnutí gelu.

5.2 Experiment 2

Při druhém experimentu jsou výsledky konfluence před seškrábnutím gelu dle předpokladu. Nejvyšší hodnotu má jamka (I) a nejnižší jamka (III), viz graf 5.2a. Výsledky po seškrábnutí gelu ovšem už dle předpokladu úplně nevychází. Problém je pouze u jamky (III), která by měla mít hodnotu nejvyšší, ale naopak má hodnotu

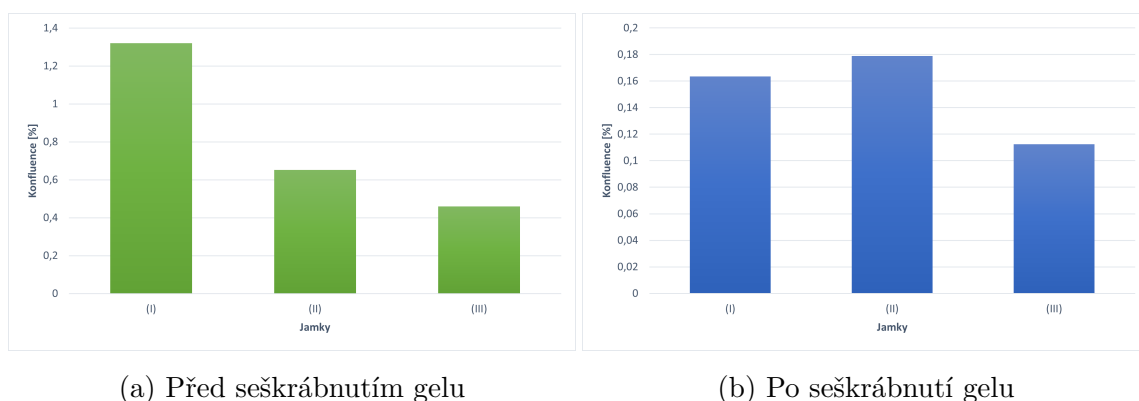
nejnižší. U jamky (II) je konfluence očekávaně vyšší než u jamky (I). Graf 5.2b proto nemá stejné rozložení jako graf v předcházejícím experimentu a to naznačuje, že chyba se stala během přípravy jamky (III) nebo se u ní projevilo více faktorů ovlivňující výsledky najednou.



Obr. 5.2: Grafy vyhodnocení experimentu 2 před a po seškrábnutí gelu.

5.3 Experiment 3

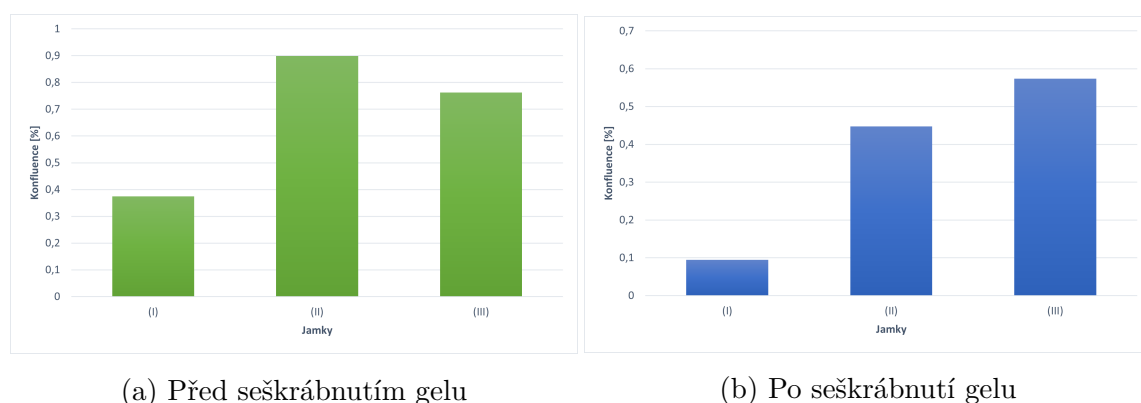
Výsledky třetího experimentu jsou velmi podobné výsledkům druhého experimentu, jak je vidět z grafů 5.3a a 5.3b. Opět hodnoty konfluence před seškrábnutím gelu odpovídají teoretickému předpokladu a opět hodnota konfluence jamky (II) po seškrábnutí gelu je vyšší než jamky (I), ale hodnota jamky (III) není očekávaně nejvyšší. Oba experimenty probíhaly ve stejný den, takže se jeví jako nejpravděpodobnější, že u přípravy jamky (III) došlo k pochybení.



Obr. 5.3: Grafy vyhodnocení experimentu 3 před a po seškrábnutí gelu.

5.4 Experiment 4

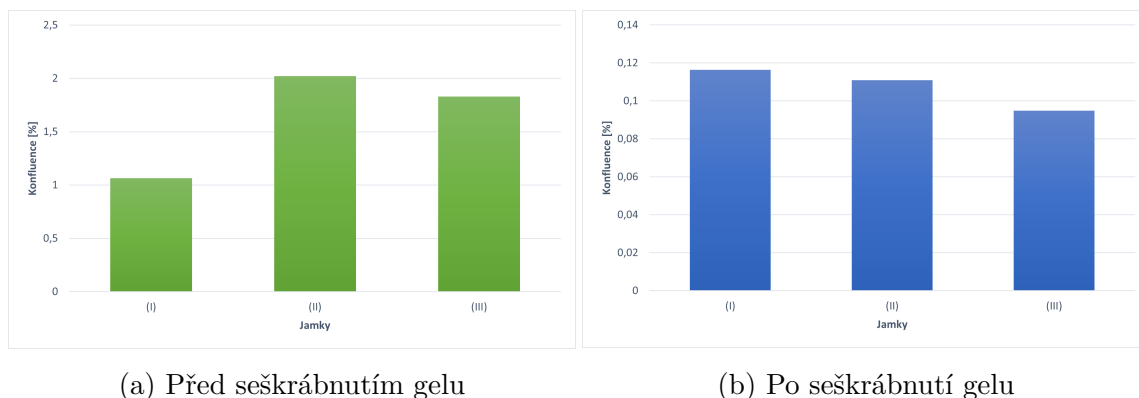
Z grafu 5.4b je zřejmé, že hodnoty konfluence po seškrábnutí gelu vyšly přesně jak bylo předpokládáno. Konfluence jamky (III) je nejvyšší, jamka (II) má hodnotu pouze o necelé dvě desetiny procenta nižší a hodnota jamky (I) je zřetelně nejnižší. I přes správné výsledky u konfluence po seškrábnutí gelu, před ním naopak výsledky neodpovídají předpokladům. V grafu 5.4a je vidět, že místo toho, aby hodnota konfluence jamky (I) byla nejvyšší, tak je nejnižší. Tento výsledek byl nejspíše znovu způsoben oněmi zmíněnými faktory při snímání membrány.



Obr. 5.4: Grafy vyhodnocení experimentu 4 před a po seškrábnutí gelu.

5.5 Experiment 5

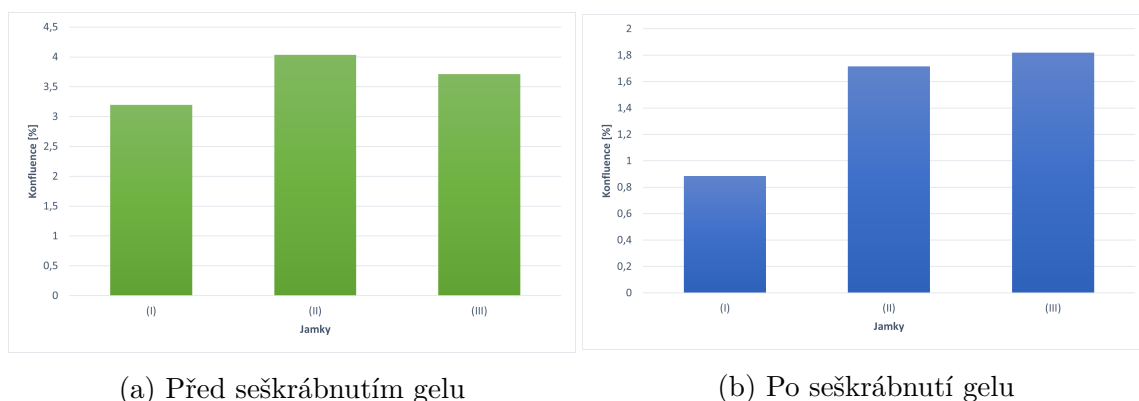
Výsledky konfluence před ani po seškrábnutí neodpovídají u pátého experimentu předpokladům. Hodnoty před seškrábnutím gelu se chovají stejně jako u předchozího experimentu. Opět je hodnota jamky (I) nejnižší, viz graf 5.5a. Z grafu 5.5b je zřetelné, že hodnoty konfluence po seškrábnutí gelu jsou si velmi blízké. Rozdíly mezi nimi jsou pouze v setinách procent, což by se velmi podobalo případu, když by do jamek nebyl přidán žádný chemoatraktant. Vzhledem k tomu, že chemoatraktant pochopitelně přidán byl, tak jsou tyto výsledky způsobeny něčím jiným. Hodnoty konfluence před seškrábnutím gelu jsou v podobném rozmezí jako u zbylých experimentů, dokonce je v některých případech převyšují, což napovídá tomu, že tyto výsledky jsou způsobeny při snímání membrány a ne při přípravě jamek. Naopak v podstatě stejné hodnoty konfluence po seškrábnutí gelu by mohly vypovídat o chybě při fixaci a barvení buněk barvivem DAPI.



Obr. 5.5: Grafy vyhodnocení experimentu 5 před a po seškrábnutí gelu.

5.6 Experiment 6

Hodnoty konfluence po seškrábnutí gelu jsou u šestého experimentu dle očekávání. Konfluenci v jamce (II) i (III) výrazně převyšuje konfluenci negativní kontroly jamky (I). Navíc jamka (III) dosáhla vyšší hodnoty než jamka (II), viz graf 5.6b. Výsledné hodnoty konfluence před seškrábnutím vyšly podobně jako u experimentu 4 či 5. Opět jamka (I) nemá předpokládanou nejvyšší hodnotu, viz graf 5.6a.

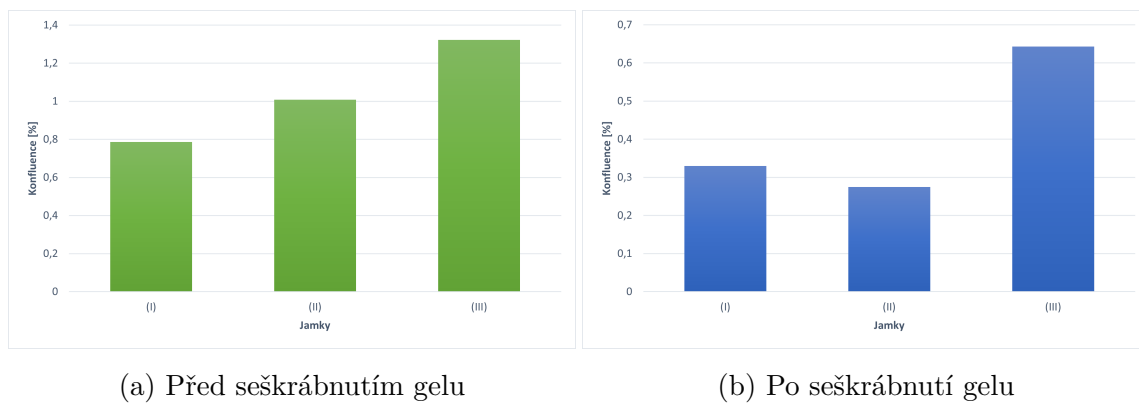


Obr. 5.6: Grafy vyhodnocení experimentu 6 před a po seškrábnutí gelu.

5.7 Experiment 7

U experimentu 7 jsou výsledné hodnoty konfluence před seškrábnutím gelu přesně v opačném pořadí než byl daný předpoklad. Z grafu 5.7a je zřejmé, že jamka (I) má nejnižší a jamka (III) nejvyšší hodnotu. V grafu 5.7b zobrazující konfluenci po seškrábnutí gelu je vidět, že hodnota konfluenci jamky (III) je výrazně vyšší než

jamky (I), jak bylo očekáváno. Hodnota jamky (II) je ovšem naopak nižší, k chybě nejspíše došlo v průběhu fixace buněk.



Obr. 5.7: Grafy vyhodnocení experimentu 7 před a po seškrábnutí gelu.

Závěr

Cílem této diplomové práce bylo provést literární rešerši v oblasti sledování migrace buněk *in vitro* v extracelulárním matrix, navrhnout experiment pro studium migrace mesenchymálních kmenových buněk v extracelulárním matrix na principu chemotaxe a prakticky ověřit teoreticky nastudovanou kultivaci buněčné linie mesenchymálních kmenových buněk v buněčné laboratoři.

První dvě kapitoly obsahují onu literární rešerši, která se nejdříve zaměřuje na objasnění termínů jako je extracelulární matrix, migrace a její základní rozčlenění. Následuje výčet a popis základních metod určených pro sledování migrace buněk. Podrobněji je zde popsána metoda transwell testu, která byla zvolena pro experiment této diplomové práce. V poslední podkapitole je vysvětlen pojem konfokální mikroskop a blíže popsán mikroskop Leica TCS SP8 X, který byl použit při experimentu. Ve druhé kapitole je rozebrána definice, význam a funkce mesenchymálních kmenových buněk v organismu. Dále se zde nachází popis chemotaxe a jejích specifík. Konkrétněji je vysvětlen i pojem komunikační osa SDF-1/CXCR4. Na závěr je uvedeno několik možností, jak zajistit úspěšnější migraci mesenchymálních kmenových buněk na místo nutnosti v organismu.

Obsahem třetí kapitoly je praktická část této diplomové práce, která má za cíl ověřit pozitivní chemotaxi MSC při působení chemotaktického gradientu v extracelulárním matrix. Nejprve je uveden seznam potřebného vybavení, přístrojů a chemikálií pro experiment. Následují popisy a protokoly jednotlivých kroků navrženého experimentu. Jedná se o kultivaci MSC, jejich barvení fluorescenčním barvivem CMFDA, pasážování s výpočtem koncentrace buněk v suspenzi, příprava kolagenového gelu a transwell testu. Po těchto krocích následuje inkubace a na závěr fixace a barvení jader MSC fluorescenčním barvivem DAPI. Celkem bylo provedeno sedm experimentů, při kterých byly použity vždy tři jamky transwell testu. Jamka (I) sloužila jako negativní kontrola a spodní komůrka obsahovala pouze kultivační médium. Do spodní komůrky jamky (II) a (III) byl přidán chemoatraktant PDGF-BB v koncentracích 40 ng/ml a 60 ng/ml. Membrána byla skenována v průběhu experimentu dvakrát. Nejdříve před seškrábnutím gelu z vrchní strany membrány s nastavením konfokálního mikroskopu pro snímání zeleného fluorescenčního barviva CMFDA a podruhé jako úplně poslední krok experimentu, nejdříve se stejným nastavením, a poté s nastavením pro snímání modrého fluorescenčního barviva DAPI.

Čtvrtá kapitola je zaměřena na zpracování snímků získaných z konfokálního mikroskopu. Představeny jsou její tři cíle - zjištění konfluence před a po seškrábnutí gelu a zjištění počtu buněk migrovaných skrz membránu. Ovšem kvůli tomu, že barvivo DAPI obarvilo buňky celé a ne jen jádra, jak bylo předpokládáno, tak třetí cíl nebyl naplněn. Zpracování snímků bylo provedeno v programovém prostředí Matlab

R2021a a pro každý cíl byl vytvořen skript. Tyto dva skripty se od sebe ovšem příliš nelišily, protože výstupem obou byla hodnota konfluence. Hlavním krokem skriptů byla metoda základního prahování s empiricky stanovovanými prahy. Výstupem byl binární obraz s detekovanými buňkami, ze kterého se vypočítala konečná konfluence. Při zjišťování konfluence buněk po seškrábnutí gelu byla použita pouze středová část snímku jamky, protože pomocí vatové tyčinky není možné plochu membrány setřít celou a na okrajích zůstávají zbytky gelu s buňkami, které by tak znehodnocovaly výsledky.

V poslední kapitole jsou prezentovány výsledky pro všech sedm experimentů v případě před a po seškrábnutí gelu. Hodnoty konfluence jsou zapsány ve dvou tabulkách a následně graficky zobrazeny pomocí grafů. Faktory, jako je vliv zaměřené roviny membrány při snímání a vliv buněk, které jsou adherované na vrchní straně membrány a nemigrovaly skrz ni, jsou při hodnocení výsledků konfluence po seškrábnutí gelu eliminovány. Do hodnoty konfluence se tak promítají pouze buňky migrované a adherované na spodní stranu membrány. Tyto výsledky by tedy měly mít větší váhu a vypovídající hodnotu o úspěšnosti experimentu. U experimentů 1, 4 a 6 se teoretický předpoklad prokázal a největší konfluenci měla jamka s nejvyšší koncentrací chemoatraktantu. Experimenty 2 a 3 byly prováděny ve stejný den a došlo nejspíše v chybě při přípravě jamky s nejvyšší koncentrací chemoatraktantu, protože v obou experimentech byla hodnota konfluence nižší než u jamky s negativní kontrolou. Jamky s nižší koncentrací chemoatraktantu ovšem opět v obou experimentech prokázaly vyšší migraci buněk než u negativní kontroly. Podobný problém nastal u experimentu 7, kdy jamka s nejvyšší koncentrací chemoatraktantu měla očekávaně nejvyšší hodnotu konfluence, ale jamka s koncentrací nižší měla nižší hodnotu než negativní kontrola. Experiment 5 byl nejspíše kompromitován v průběhu fixace a barvení buněk barvivem DAPI, protože hodnoty konfluence u všech tří jamek vyšly velmi podobně s minimálními rozdíly. Tento experiment tedy nemá žádnou vypovídající hodnotu. Při hodnocení výsledků konfluence před seškrábnutím gelu vyšly dle předpokladu experimenty 2 a 3. Nejvyšší konfluence dosáhla jamka s negativní kontrolou a nejnižší jamka s vyšší koncentrací chemoatraktantu. Výsledky zbylých experimentů nebyly dle očekávání, což v některých případech může být způsobeno špatnou přípravou vzorku, ale pravděpodobnější je působení různých faktorů při snímání membrán.

Díky provedeným experimentům bylo ověřeno, že MSC reagují zvýšenou mírou migrace při výskytu chemotaktického gradientu i přes překážky jakými pro ně byl kolagenový gel imitující extracelulární matrix v živém organismu a membrána transwell testu. Dalším ověřením výsledků by bylo zjištění rozdílu počtu buněk migrovaných skrz membránu u jednotlivých jamek. Tohoto cíle by bylo nejspíše možné dosáhnout zlepšením protokolu barvení buněk fluorescenčním barvivem DAPI, aby

byly obarveny pouze jádra buněk. Navržený a provedený experiment je pouze zrnkem v nespočetném počtu studií, které se migrací mesenchymálních kmenových buněk zabývají a snaží se dále rozšiřovat vědomosti, které by mohly přispět při rozvoji terapie kmenovými buňkami.

Literatura

- [1] DE PASCALIS, Chiara, Sandrine ETIENNE-MANNEVILLE a Valerie Marie WEAVER. *Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions*. Molecular Biology of the Cell [online]. 2017, 28(14), 1833-1846 [cit. 2020-10-20]. ISSN 1059-1524. Dostupné z: doi:10.1091/mbc.e17-03-0134
- [2] SINCLAIR, Kenneth, Stephanie T. YERKOVICH a Daniel C. CHAMBERS. *Mesenchymal stem cells and the lung*. Respiriology [online]. 2013, 18(3), 397-411 [cit. 2020-10-28]. ISSN 13237799. Dostupné z: doi:10.1111/resp.12050
- [3] ZACHAR, Lukáš, Darina BAČENKOVÁ a Ján ROSOCHA. *Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment*. Journal of Inflammation Research [online]. 2016, 9, 231-240 [cit. 2020-10-28]. ISSN 1178-7031. Dostupné z: doi:10.2147/JIR.S121994
- [4] BEHNKE, Judith, Sarah KREMER, Tayyab SHAHZAD, Cho-Ming CHAO, Eva BÖTTCHER-FRIEBERTSHÄUSER, Rory E. MORTY, Saverio BELLUSCI a Harald EHRHARDT. *MSC Based Therapies—New Perspectives for the Injured Lung*. Journal of Clinical Medicine [online]. 2020, 9(3) [cit. 2020-10-28]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm9030682
- [5] JIN, Wang, Xiaowen LIANG, Anastasia BROOKS, et al. *Modelling of the SDF-1/CXCR4 regulated in vivo homing of therapeutic mesenchymal stem/stromal cells in mice*. PeerJ [online]. 2018, 6 [cit. 2020-10-28]. ISSN 2167-8359. Dostupné z: doi:10.7717/peerj.6072
- [6] WEISS, Andreas Robert Rudolf a Marc Hendrik DAHLKE. *Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs*. Frontiers in Immunology [online]. 2019, 10 [cit. 2020-11-02]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.01191
- [7] KATT, Moriah E., Amanda L. PLACONE, Andrew D. WONG, Zinnia S. XU a Peter C. SEARSON. *In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology [online]. 2016, 4 [cit. 2020-11-02]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2016.00012
- [8] JUSTUS, Calvin R., Nancy LEFFLER, Maria RUIZ-ECHEVARRIA a Li V. YANG. *In vitro Cell Migration and Invasion Assays*. Journal of Visualized Experiments [online]. 2014, (88) [cit. 2020-11-02]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/51046

- [9] PIJUAN, Jordi, Carla BARCELÓ, David F. MORENO, Oscar MAIQUES, Pol SISÓ, Rosa M. MARTI, Anna MACIÀ a Anaïs PANOSA. *In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis*. Frontiers in Cell and Developmental Biology [online]. 2019, 7 [cit. 2020-11-08]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2019.00107
- [10] KOVAŘÍKOVÁ, Petra, Eva MICHALOVÁ, Lucia KNOPFOVÁ a Pavel BOU-CHAL. *Methods for Studying Tumor Cell Migration and Invasiveness*. Klinická onkologie [online]. 2014, 27(Suppl 1), S22-S27 [cit. 2020-11-08]. ISSN 0862495X. Dostupné z: doi:10.14735/amko20141S22
- [11] *In vitro přístupy k analýze migrace buněk* [online]. [cit. 2020-11-08]. Dostupné z URL: <http://organonet.med.muni.cz/media/62510/vy_04.pdf>.
- [12] ZHANG, H. *A role for the polysialic acid - neural cell adhesion molecule in PDGF-induced chemotaxis of oligodendrocyte precursor cells*. Journal of Cell Science [online]. 2004, 117(1), 93-103 [cit. 2020-11-08]. ISSN 0021-9533. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.00827
- [13] WALMA, David A. Cruz a Kenneth M. YAMADA. *The extracellular matrix in development*. Development [online]. 2020, 147(10) [cit. 2020-11-15]. ISSN 0950-1991. Dostupné z: doi:10.1242/dev.175596
- [14] *μ-Slide Chemotaxis* [online]. [cit. 2020-11-16]. Dostupné z URL: <<https://ibidi.com/channel-slides/9--slide-chemotaxis-ibitreat.html>>.
- [15] *Collagen Type I, Rat Tail* [online]. [cit. 2020-11-16]. Dostupné z URL: <<https://ibidi.com/cell-culture-microscopy/107-collagen-type-i-rat-tail.html>>.
- [16] *What steps are involved in Lamellipodia assembly?* [online]. [cit. 2020-11-29]. Dostupné z URL: <<https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics/what-are-lamellipodia-and-lamella/what-steps-are-involved-in-lamellipodia-assembly/>>.
- [17] *Modes of Cell Migration* [online]. [cit. 2020-11-29]. Dostupné z URL: <<https://cytosmart.com/resources/modes-of-cell-migration>>.
- [18] KASALOVÁ, Lenka. *In vitro analýza améboidně-mezenchymálního přechodu A375M2 melanomových buněk*. Praha, 2010. Dostupné také z: <https://core.ac.uk/download/pdf/144328739.pdf>. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie. Vedoucí práce RNDr. Daniel Rösel, PhD.

- [19] *Bürkerova komůrka* [online]. [cit. 2020-12-30]. Dostupné z URL: <<http://kchbi.chnikf.stuba.sk/LabMikro/doc/7cvicenie.pdf>>.
- [20] *Počítání v Bürkerově komůrce* [online]. [cit. 2020-12-30]. Dostupné z URL: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2016/Bi8250c/um/52403632/53116324/Pocitani_v_Burkerove_komurce.pdf>.
- [21] *CellTracker™ Green CMFDA Dye* [online]. [cit. 2020-12-30]. Dostupné z URL: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C2925#/C2925>>.
- [22] PLÁŠEJ, Jaromír. *Konfokální mikroskop* [online]. [cit. 2020-12-31]. Dostupné z URL: <<https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1995/cislo-9/konfokalni-mikroskop.html>>.
- [23] *Leica TCS SP8X* [online]. [cit. 2020-12-31]. Dostupné z URL: <<https://www.pragolab.cz/opticke-mikroskopy/konfokalni-mikroskopy/leica-tcs-sp8x>>.
- [24] *Confocal Microscopy* [online]. [cit. 2020-12-31]. Dostupné z URL: <<https://www.laser2000.co.uk/applications/confocal-microscopy>>.
- [25] *The Role of Chemotaxis in Cell Physiology* [online]. [cit. 2021-01-01]. Dostupné z URL: <<https://ibidi.com/content/313-chemotaxis-in-cell-physiology>>.
- [26] *Chemotaxis* [online]. [cit. 2021-01-01]. Dostupné z URL: <[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3AMicrobiology_\(Boundless\)/7%3AMicrobial_Genetics/7.21%3ASensing_and_Signal_Transduction/7.21A%3A_Chemotaxis](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3AMicrobiology_(Boundless)/7%3AMicrobial_Genetics/7.21%3ASensing_and_Signal_Transduction/7.21A%3A_Chemotaxis)>.
- [27] KESHAVARZ, Samaneh, Seyed Mahdi NASSIRI, Vahid SIAVASHI a Nika Sadat ALIM. *Regulation of plasticity and biological features of endothelial progenitor cells by MSC-derived SDF-1*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. 2019, 1866(2), 296-304 [cit. 2021-01-01]. ISSN 01674889. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2018.11.013
- [28] ZHANG, S.-J., X.-Y. SONG, M. HE a S.-B. YU. *Effect of TGF- β 1/SDF-1/CXCR4 signal on BM-MSCs homing in rat heart of ischemia/perfusion injury*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016 Mar;20(5):899-905. PMID: 27010148.
- [29] XU, Wei, Ruijun XU, Zhikun LI, Yi WANG a Ruixi HU. *Hypoxia changes chemotaxis behaviour of mesenchymal stem cells via HIF-1 signalling*. *Journal*

- of Cellular and Molecular Medicine [online]. 2019, 23(3), 1899-1907 [cit. 2021-01-02]. ISSN 15821838. Dostupné z: doi:10.1111/jcmm.14091
- [30] BIDKHORI, Hamid Reza, Naghmeh AHMADIANKIA, Maryam Moghaddam MATIN, Asieh HEIRANI-TABASI, Moein FARSHCHIAN, Hojjat NADERI-MESHKIN, Mina SHAHRIYARI, Mahtab DASTPAK, Ahmad Reza BAHRAMI. *Chemically primed bone-marrow derived mesenchymal stem cells show enhanced expression of chemokine receptors contributed to their migration capability*. Iran J Basic Med Sci. 2016 Jan;19(1):14-9. PMID: 27096059; PMCID: PMC4823610.
- [31] HUANG, Chuanjun, Longxiang ZHAO, Jun GU, et al. *The migration and differentiation of hUC-MSCs CXCR4/GFP encapsulated in BDNF/chitosan scaffolds for brain tissue engineering*. Biomedical Materials [online]. 2016, 11(3) [cit. 2021-01-02]. ISSN 1748-605X. Dostupné z: doi:10.1088/1748-6041/11/3/035004
- [32] ZUMBERG, Inna. *Sledování migrace mesenchymálních kmenových buněk v extracelulární matrix* [online]. Brno, 2020 [cit. 2021-01-5]. Dostupné z URL: <<https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/126854>>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce Larisa Baiazitova.
- [33] POŠUSTOVÁ, Veronika. *Studium migrace mesenchymálních kmenových buněk na principu chemotaxe* [online]. Brno, 2020 [cit. 2021-01-05]. Dostupné z URL: <<https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/126748>>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce Larisa Baiazitova.
- [34] DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) [online]. [cit. 2021-01-05]. Dostupné z URL: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D1306#/D1306>>.
- [35] Corning® Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts [online]. [cit. 2021-04-18]. Dostupné z URL: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cls3422?lang=en®ion=CZ>>.
- [36] PHIPPS, Mathew C., Yuanyuan XU, Susan L. BELLIS. *Delivery of Platelet-Derived Growth Factor as a Chemotactic Factor for Mesenchymal Stem Cells by Bone-Mimetic Electrospun Scaffolds* [online]. [cit. 2021-04-24]. Dostupné z: 10.1371/journal.pone.0040831

- [37] CHENG, Peng, Zhi-qiang GAO, Yun-hui LIU a Yi-xue XUE. *Platelet-derived growth factor BB promotes the migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells towards C6 glioma and up-regulates the expression of intracellular adhesion molecule-1*. Neuroscience Letters [online]. 2009, 451(1), 52-56 [cit. 2021-4-24]. ISSN 03043940. Dostupné z: doi:10.1016/j.neulet.2008.12.044
- [38] ZHANG, Jia-min, Fei-er FENG, Qian-ming WANG, et al. *Platelet-Derived Growth Factor-BB Protects Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Derived From Immune Thrombocytopenia Patients Against Apoptosis and Senescence and Maintains MSC-Mediated Immunosuppression*. STEM CELLS Translational Medicine [online]. 2016, 5(12), 1631-1643 [cit. 2021-5-20]. ISSN 21576564. Dostupné z: doi:10.5966/sctm.2015-0360

Seznam symbolů, veličin a zkratek

CMFDA	fluorescenční barvivo CellTracker™ Green CMTDA
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DAPI	fluorescenční barvivo DAPI
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
HIF-1α	hypoxicky indukibilní faktor 1 α - hypoxia-inducible factor 1 α
ECM	extracelulární matrix
IL-1	Interleukin 1
MSC	mesenchymální kmenové buňky - mesenchymal stem cells
PBS	fosfátový pufr - phosphate buffered saline
PDGF-BB	destičkový růstový faktor BB - platelet-derived growth factor-BB
SDF-1	faktor 1 odvozený od stromálních buněk - the stromal cell-derived factor 1
TGF-β	transformující růstový faktor β - transforming growth factor β
TNF-α	faktor nádorové nekrózy α - tumor necrosis factor α